



Le quorum sensing bactérien dans l'environnement marin : diversité moléculaire et génétique des auto-inducteurs

Margot Doberva

► To cite this version:

Margot Doberva. Le quorum sensing bactérien dans l'environnement marin : diversité moléculaire et génétique des auto-inducteurs. Ecosystèmes. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066049 . tel-01377951

HAL Id: tel-01377951

<https://theses.hal.science/tel-01377951>

Submitted on 8 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale 227 MNHN-UPMC « Sciences de la Nature et de l'Homme : évolution et écologie »

Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes USR 3579 LBBM

Présentée par : **Margot Doberva**

Pour obtenir le grade de : **Docteur**

Spécialité : **Ecologie Microbienne**

Le quorum sensing bactérien dans l'environnement marin: Diversité moléculaire et génétique des auto-inducteurs

Dirigée par :

Philippe LEBARON : Directeur de thèse HDR

Raphaël LAMI co-encadrant de thèse

Sophie SANCHEZ-FERANDIN co-encadrante de thèse

Soutenue publiquement le 06/04/2016 devant un jury composé de :

Pr MARECHAL Vincent (HDR) UPMC

Dr CULIOLI Gérard (HDR) UTLN

Dr ROLLAND Jean-Luc IFREMER

Pr WISNIESKY-DYE Florence (HDR) UCB

Dr BANAIGS Bernard UPVD-INSERM

Pr LEBARON Philippe (HDR) UPMC-OOB

Dr LAMI Raphaël UPMC-OOB

Dr SANCHEZ-FERANDIN Sophie UPMC-OOB

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

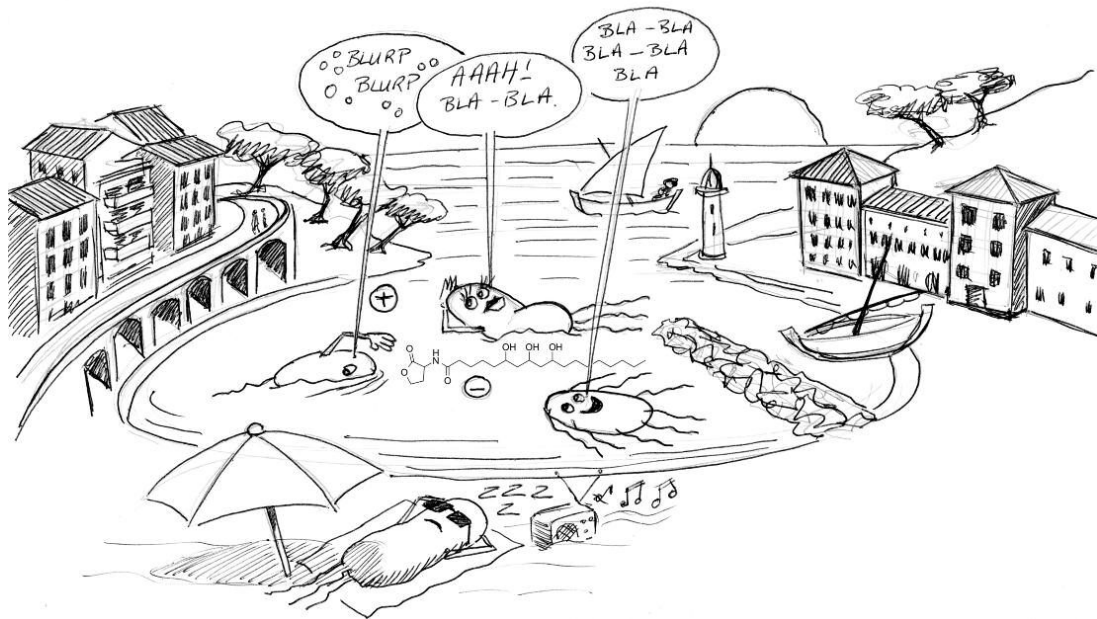
Examineur

Directeur de thèse

Co-encadrant de thèse

Co-encadrante de thèse

Quorum Sensing in the Sea



Dédicace

Au passé : A mes tontons Armand, Parrain & Patou

A ma mamie Antoinette

A l'avenir : A ma Loïssane

Citation

Dans la nature, tout a toujours une raison.
Si tu comprends cette raison, tu n'as plus besoin de l'expérience.

Léonardo Da Vinci

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à Gérald CULIOLI et Jean-Luc ROLLAND pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi qu'à Vincent MARECHAL, Florence WISNIESKY-DYE et Bernard BANAIGS pour s'être déplacé à Banyuls-sur-Mer, afin d'examiner mon travail.

Un grand merci à mon directeur de thèse Philippe LEBARON et surtout à mes co-encadrants de thèse Sophie SANCHEZ-FERANDIN et Raphaël LAMI pour m'avoir guidée et soutenue depuis mon stage de master 2 et pendant mes trois années de doctorat. Vous m'avez donné la chance d'intégrer le Laboratoire Arago (je ne pouvais pas espérer mieux comme cadre de travail et je vous en suis reconnaissante), et les moyens de mener à bien mon projet doctoral (science, encadrement, matériel, missions, congrès, innombrables relecture du manuscrit...).

Je remercie le précédent et l'actuel directeur du Laboratoire Arago - Observatoire Océanologique respectivement Philippe Lebaron et Vincent Laudet.

Je remercie Stéphane Blain et tous les membres du LOMIC pour ces deux premières années (2012-2013) passées au bâtiment A.

Je remercie Marcelino Suzuki et tous les membres du LBBM pour ces deux dernières années de thèse (2014-2015) passées au bâtiment B.

La science n'a pas de frontières !

Merci à Dave Kirchman et Matt Cottrell ainsi que toute leur équipe pour m'avoir reçu pendant 7 semaines dans leur laboratoire aux USA, merci pour les discussions scientifiques et la campagne d'échantillonnage. Ce fut un séjour très enrichissant tant sur le plan scientifique qu'humain et culturel.

Merci aux membres de l'EDDV 392 pour les deux séjours d'intégration à Roscoff (2012 & 2013). Daniel, Marc et Hugo L. et tous les autres doctorants tant de moments scientifiques et festifs partagés !

Merci à Véronique Eparvier et sa super équipe "Substances Naturelles et Biodiversité" de l'ICSN de Gif-sur-Yvette : Seindé, Amandine, Layani et Yannick de m'avoir reçu en décembre 2014 et à Nathalie HUE de t'être autant impliquée dans les manips de chromatographie et spectrométrie de masse.

Merci à Eve Toulza pour tout ce que tu m'as appris en bio-informatique ce n'était pas gagné mais grâce à ta patience et ta pédagogie j'ai beaucoup progressé. Merci pour ta gentillesse, ta réactivité et d'avoir pris le temps de me former. J'espère que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble.

Merci à Didier Stien pour ta disponibilité, pour m'avoir enseigné tant de choses en chimie des substances naturelles, de l'extraction des molécules jusqu'à la résonance magnétique nucléaire ! J'espère que dans l'avenir nous collaborerons encore pour découvrir de nouvelles molécules toujours plus incroyables !

Merci à tous les membres permanents ou non du Laboratoire Arago - Observatoire Océanologique, marins, personnels plateforme, stagiaires, bibliothécaires, ingénieurs, secrétaires, techniciens, chercheurs et maîtres de conférence... qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail de thèse.

Merci au club de course à pied Elisa, Serge, Nyree, Sheree, Rémi, Claire pour ces moments sportifs qui m'ont permis ces derniers mois d'évacuer tout le stress de la rédaction du manuscrit de thèse et de profiter de magnifiques panoramas de la baie de Banyuls.

Merci au groupe des doctorants présents Marc pour tes théories sur la vie, les *Homo sapiens* et leur progéniture, les félins, la politique et surtout les Chinchillas, Hugo L. le virologue Jedi, Mathieu la machine à publier rrrrr, Sandrine la modélisatrice merci pour tous ces moments à discuter de science et de potins, Daniel et Antony les amphioxus buveurs de bière, Amandine & Claire D. les sportives, Laetitia & Stefan les petits nouveaux qui reprennent le flambeau, sans oublier ma petite Elise !! Et aux doctorants passés Mamamarine & Mamamarion que de bons moments passés dans le 3 MAR bureau (MARion, MARine, MARgot) mar signifie la mer en espagnol, comme quoi il faut croire au destin, la douce Mareike, Tatiana la guerrière et la reine des sushis (sans oublier ton Rémy), Romain, Denisse, Julie Mme Crambe crambe, Mariana, Sabrina, Karine, Lionel, Hugo B., Elsa la rebelle, Yann le roi du cafétito et des frites un vrai breton, un vrai raleur et une vraie pipelette merci pour les pauses café obligatoires (je déteste le café et le thé mais j'adore les pauses) !!

Merci à Elo et Claire H. pour les repas du midi au soleil, les pieds dans la mer et les discussions en tout genre.

Merci à tous pour les super soirées organisée ou imprévues : barbecue, soirées pizzas, mariages, fêtes de thèse et autres occasions de faire la fête et partager de bons moments.

Merci à ma famille les Doberva, Molas et bien sur les Lo-Giudice. Papa, maman Léo mon frère vous êtes avec moi depuis toujours et je l'espère pour toujours. Merci pour votre soutien, votre optimisme et votre chaleur. Papi & Mamie merci d'être toujours là disponible à chaque instant et d'avoir pris soin de moi depuis le début de ma vie.

Mon Mikalinou ça fait déjà dix ans que l'on partage nos vies, dix ans que tu me supportes, que tu me soutiens, que tu me fais rêver, que tu me pousses vers le haut. Et que tu respectes la passion que j'ai pour les sciences et la nature. Et depuis presque un an nous sommes 3.

Ma Loïssane, mon *Gnomus chronophagus* tu es le bébé le plus merveilleux du monde ! Te regarder grandir, évoluer et t'épanouir chaque jour est une expérience extraordinaire.

Sommaire

<i>REMERCIEMENTS</i>	7
SOMMAIRE	9
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	15
TABLE DES ILLUSTRATIONS	17
TABLE DES TABLEAUX	19
CHAPITRE I : INTRODUCTION : LA COMMUNICATION INTER-CELLULAIRE CHEZ LES MICRO-ORGANISMES	23
I-1 LES BACTERIES MARINES ET LEURS ENVIRONNEMENTS	23
I-1-1 LES BACTERIES MARINES: QUELLE PLACE DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN ?	23
I-1-1-1 Les bactéries libres : la colonne d'eau	24
I-1-1-2 Les bactéries attachées : la neige marine	24
I-1-1-3 Les bactéries associées au phyto- et zoo- plancton	25
I-1-1-4 La communauté bactérienne du sédiment	25
I-1-1-5 Les bactéries associées aux macro-algues	25
I-1-1-6 Les bactéries associées aux plantes	26
I-1-1-7 Les bactéries associées aux invertébrés marins	26
I-1-1-8 Les bactéries associées aux vertébrés marins	27
I-1-2 L'IMPLICATION DES BACTERIES MARINES DANS LE RESEAU TROPHIQUE ET LES CYCLES BIOGEOCHIMIQUES	27
I-1-3 DE L'ECOLOGIE MICROBIENNE A L'ECOLOGIE CHIMIQUE	29
I-2 LE QUORUM SENSING : LA COMMUNICATION BACTERIENNE INTERCELLULAIRE	31
I-2-1 HISTORIQUE : DE L'ETUDE DE LA BIOLUMINESCENCE A LA DECOUVERTE ET LA COMPREHENSION DU MECANISME DE QUORUM SENSING	31
I-2-2 LE MECANISME GENERAL DU QUORUM SENSING BACTERIEN	32
I-2-3 LES PHENOTYPES REGULES PAR QUORUM SENSING CHEZ LES BACTERIES	34
I-2-3-1 La nodulation	34
I-2-3-2 Les facteurs de virulence	35
I-2-3-3 La mobilité bactérienne	35
I-2-3-4 La fructification	36
I-2-3-5 Le transfert d'ADN	36
I-2-3-6 Les biofilms	36
I-2-3-7 Les produits extracellulaires	37
I-2-3-8 L'incorporation du phosphore	37
I-2-3-9 La morphologie cellulaire	38
I-2-3-10 La bioluminescence	38
I-2-4 LES MOLECULES SIGNAL CHEZ LES BACTERIES	39
I-2-4-1 Les Auto-Inducteurs de types 1 et 2 : molécules et gènes codant les voies de biosynthèse	40
I-2-4-1-1 Les Auto-Inducteurs de type 1 (AI-1)	40
I-2-4-1-2 L'Auto-Inducteur de type 2 (AI-2)	43
I-2-4-1-3 Phylogénie des gènes impliqués dans la production des AI-1 & -2	44
I-2-4-2 Les autres molécules signal	48
I-2-4-2-1 L'Auto-Inducteur de type 3 (AI-3)	48
I-2-4-2-2 Le Cholerae Auto-Inducteur (CAI)	48

I-2-4-2-3 Le 3-hydroxy Palmitic Acid Methyl Ester (PAME)	48
I-2-4-2-4 Le Pseudomonas Quinolone Signal (PQS)	49
I-2-4-2-5 Les DiKetoPiperazines (DKP)	49
I-2-4-2-6 Les Diffusible Signal Factor (DSF)	50
I-2-4-2-7 Le butyrolactone (GBL)	51
I-2-4-2-8 Les facteurs A/B/C/D/E	51
I-2-4-2-9 Les Auto-Inducing Peptides (AIP)	51
I-2-4-2-10 La bradyoxetine (CDF)	52
I-2-4-2-11 L'indole : l'acide indole-3-acétique (IAA)	53
I-2-4-2-12 L'acide tropodithietique (TDA)	53
I-2-4-4 Les AI-1 : centre des interconnexions de plusieurs voies de QS bactérien	55
I-2-4-5 Les autres activités biologiques des molécules signal	56
I-2-5 L'INHIBITION DU QUORUM SENSING BACTERIEN	57
I-2-5-1 Les facteurs abiotiques	57
I-2-5-2 Les inhibiteurs moléculaires (mimétisme et réaction chimique)	58
I-2-5-3 Les enzymes (acylases et lactonases)	60
I-2-5-4 Les applications de l'inhibition du quorum sensing	61
I-2-6 LE QUORUM SENSING INTRA- ET INTER- DOMAINES	62
I-2-6-1 La communication intra-domaine	62
I-2-6-1-1 Le quorum sensing entre les Archées	62
I-2-6-1-2 Le quorum sensing entre les Eucaryotes	63
I-2-6-3 La communication inter-domaines	64
I-2-6-3-1 La communication entre les plantes et les bactéries	64
I-2-6-3-2 La communication entre les animaux et les bactéries	65
I-2-7 INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT ET CONCEPT DE QUORUM SENSING	65
I-2-8 QUELS MECANISMES DE QUORUM SENSING BACTERIEN SONT RETROUVES DANS LES DIFFERENTS ECOSYSTEMES MARINS ?	67
I-2-8-1 Le QS chez bactéries libres de la colonne d'eau	67
I-2-8-2 Le QS chez les bactéries attachées	68
I-2-8-3 Le QS dans la communauté bactérienne du sédiment	68
I-2-8-4 Le QS chez bactéries associées au plancton	69
I-2-8-5 Le QS chez les bactéries associées aux macro-algues	70
I-2-8-6 Le QS chez les bactéries associées aux plantes	70
I-2-8-7 Le QS chez les bactéries associées aux invertébrés marins	70
I-2-8-8 Le QS chez les bactéries associées aux vertébrés marins	71
I-3 LES OBJECTIFS ET LES METHODES DE CE TRAVAIL DE RECHERCHE	72
I-3-1 LES OBJECTIFS DE CETTE THESE DE DOCTORAT	72
I-3-1-1 Quelle est la diversité taxonomique et moléculaire des bactéries marines cultivables utilisant le QS basé sur les AI-1 ?	73
I-3-1-2 Quelle est la prévalence du quorum sensing basé sur les AI- et -2 chez les bactéries marines ?	74
I-3-1-3 Quel est le rôle fonctionnel du QS chez les <i>Rhodobacteraceae</i> dans l'environnement marin naturel ?	75
I-3-2 QUELLES TECHNIQUES UTILISER POUR ABORDER LES QUESTIONS LIEES AU QUORUM SENSING EN MILIEU MARIN ?	76
I-3-2-1 Les méthodes dépendantes des techniques de culture : de la microbiologie pasteurienne aux approches de chimie des substances naturelles	76
I-3-2-2 Les méthodes indépendantes des techniques de culture : les approches de génomique environnementale	77

<u>CHAPITRE II : PUBLICATION : LARGE DIVERSITY AND ORIGINAL STRUCTURES OF AHLs IN <i>MARIBIUS</i> SP MOLA 401, AN OLIGOTROPHIC MARINE ROSEOBACTER BACTERIA</u>	83
ABSTRACT	84
INTRODUCTION	85
MATERIALS & METHODS	88
CULTURE OF <i>MARIBIUS</i> MOLA 401 STRAIN	88
PHYLOGENETIC ANALYSES OF <i>MARIBIUS</i> MOLA 401 16S rRNA AND QUORUM SENSING GENES	88
AHLs STANDARDS USED IN THIS STUDY	89
EXTRACTION OF AHLs FROM <i>MARIBIUS</i> SP. MOLA 401 SUPERNATANTS	89
HPLC MICROFRACTIONNEMENT	90
CULTURE OF BIOSENSOR STRAINS	90
LC-MS ANALYSES	91
MS/MS SPECTRA DESCRIPTION	93
MOLECULAR FORMULA DETERMINATION	94
RESULTS & DISCUSSION	95
PRESENCE AND CHEMICAL FEATURES OF AHLs IN <i>MARIBIUS</i> SP.	95
LINKING GENETIC AND CHEMICAL FEATURES	99
ECOLOGY OF <i>MARIBIUS</i> SP. MOLA401	103
CONCLUSIONS	104
ACKNOWLEDGEMENTS	105
BIBLIOGRAPHY	106
SUPPLEMENTARY FIGURE : CHROMATOGRAMS OF FRACTIONS M1-M22 AND AHLs MS/MS SPECTRA (FROM A TO U)	111
<u>CHAPITRE III : PUBLICATION : DIVERSITY OF QUORUM SENSING AUTOINDUCER SYNTHASES IN THE GLOBAL OCEAN SAMPLING METAGENOMIC DATABASE</u>	125
ABSTRACT	126
INTRODUCTION:	127
MATERIALS & METHODS	130
CONSTRUCTION OF REFERENCE DATABASES FOR AI SYNTHASE PROTEINS	130
SCREENING FOR AI SYNTHASES IN THE GOS METAGENOME	130
NORMALIZATION OF AI COUNTS IN GOS METAGENOMES TO SINGLE COPY GENES	131
PHYLOGENETIC ANALYSIS	132
RESULTS	133
FEATURES OF AI SYNTHASE PROTEIN REFERENCE DATABASES	133
ABUNDANCE AND DIVERSITY OF LuxI SYNTHASES IN THE GOS DATASET	135
ABUNDANCE AND DIVERSITY OF HdtS SYNTHASES IN THE GOS DATASET	137
ABUNDANCE AND DIVERSITY OF LuxS SYNTHASES IN THE GOS DATASET	141
DIVERSITY OF AinS SYNTHASES IN THE GOS DATASET	143
CORRELATION WITH ENVIRONMENTAL VARIABLES	143
DISCUSSION	145
ACKNOWLEDGEMENTS	149
BIBLIOGRAPHY	150

<u>CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES : DIVERSITE, PREVALENCE ET EXPRESSION DU QUORUM SENSING BASE SUR LES AHLs DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN</u>	159
V-1 QUELLE EST LA PREVALENCE DU QS BASE SUR LES AHLs DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN ?	159
V-1-1 LA PRESENCE D'AHLs CHEZ LES BACTERIES ISSUES DES DIVERS ECOSYSTEMES MARINS	159
V-1-2 LA PRESENCE DE GENES CODANT LES AHL SYNTHASES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN	167
V-1-3 L'EXPRESSION DES GENES CODANT LES AHL SYNTHASES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN	169
V-2 QUELS LIENS ENTRE LA DIVERSITE MOLECULAIRE DE LA FAMILLE DES AHLs ET CELLE DES GENES CODANT LES AHL SYNTHASES ?	172
V-2-1 LA FAMILLE DE GENES CODANT LES AHL SYNTHASE LUXI	172
V-2-2 LA FAMILLE DE GENES CODANT LES AHL SYNTHASES HDTS	172
V-2-3 LIEN GENE CODANT L'AHL SYNTHASE ET AHLs SYNTHETISEES	173
V-3 QUELS SONT LES ROLES FONCTIONNELS DES AHLs DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN ?	174
V-3-1 DIVERSITE POTENTIELLE DES FONCTIONS DES AHLs	174
V-3-2 SUIVI ENVIRONNEMENTAL DE L'EXPRESSION DU GENE <i>LUXI</i> DE <i>ROSEOBACTER</i>	175
V-3-3 EXTINCTION DU GENE <i>LUXI</i> DE <i>MARIBIUS SP</i> : TROUVER LE(S) PHENOTYPE(S) REGULE(S)	176
<u>BIBLIOGRAPHIE GENERALE</u>	179

ANNEXES	209
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES LIEES A CE TRAVAIL DE THESE	209
PRESENTATIONS ORALES	209
POSTER	209
ARTICLES SCIENTIFIQUES ORIGINAUX ET DE REVUE	211
Genome sequence of the sponge associated <i>Ruegeria halocynthiae</i> Strain MOLA R1/13b, a marine <i>Roseobacter</i> with two quorum sensing based communication systems	212
ABSTRACT	213
GENOME ANNOUNCEMENT	213
REFERENCES	215
Genome sequence of <i>Maribius</i> sp. Strain MOLA 401, a marine <i>Roseobacter</i> with a quorum sensing cell dependent physiology	217
ABSTRACT	218
GENOME ANNOUNCEMENT	218
REFERENCES	220
Revue : Fundamental aspects of bioluminescence in marine microorganisms	225
ABSTRACT	226
INTRODUCTION	227
BIOLUMINESCENCE IN DINOFLAGELLATES	229
“Shining” sea and spatial distribution of bioluminescent dinoflagellates	229
Ecological function of bioluminescence	237
Three mostly studied bioluminescent species	238
Regulation of bioluminescence in dinoflagellates	240
General aspects	240
The dinoflagellate flash model	243
Clock control in <i>Lingulodinium polyedrum</i>	244
Scintillon translocation in <i>Pyrocystis</i>	245
BIOLUMINESCENCE IN MARINE BACTERIA	246
Milky sea phenomenon and ecological function of bioluminescence	246
The taxonomy of bioluminescent bacteria	247
Quorum sensing and lux-related light production	250
General aspects	250
Regulation of <i>Vibrio fischeri</i> bioluminescence by quorum sensing	251
<i>Vibrio fischeri</i> versus <i>V. harveyi</i> bioluminescence regulation	253
Bioluminescent bacteria living in symbiosis	255
Vibrios - metazoan associations	255
Ecological consequences of host-symbiont interaction	256
CONCLUSION	259
ACKNOWLEDGEMENTS	261
TABLEAUX ANNEXES	279
Schéma bilan de cette thèse de doctorat	311

Liste des abbréviations

A : Adénine
acyl-ACP : acylated Acyl Carrier Protein
ACN : Acetonitrile
ADN : Acide DéshoxyriboNucléique
AHL : AcylHomosérine Lactone
AI : AutoInducteur
AI-1 : AutoInducteur de type 1
AI-2 : AutoInducteur de type 2
AI-3 : AutoInducteur de type 3
AIP : Auto-Inducing Peptide
ARN : Acide RiboNucléique
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine-5'-triphosphate
BET : Bromure d'ETHidium
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
°C: Degré Centigrade
CAI-1 : Cholerae Auto-Inducer type 1
C : Cytosine
Chl-a : Chlorophyll-a
COD : Carbon organic Dissout
DMSO : DiMéthylSulfOxide
dNTPs : Désoxyribonucléotides
DKP : DiKetoPiperazine
DGGE : Denaturing Gel gradient Electrophoresis
DPD : 4,5-Dyhydroxy-2,3-PentaneDione
DO : Densité Optique
DSF : Diffusible Signal Factor
ESI : Electrospray Ionisation
EDTA : Ethylène Diamine TétrAcétate
EHEC : EnteroHemorrhagic E. Coli serotype 0157H7
EPS : ExoPolySaccharide
et al. : et alteri
EtOH : ethanol
G : Guanine
GBL : Gamma Butyro Lactone
GFP : Green Fluorescent Protein
GOS : Global Ocean Sampling/Survey
HSL : HomoSerine Lactone
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
IAA : Indole Acetic Acid
kb : KiloBase
kg : KiloGramme
LB : milieu de Luria & Bertani
LC : Liquid Chromatography
LC/MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LPS : LipoPolySaccharide
m : mètre
M: Molaire
MB : Marine broth
MeOH : Méthanol
mg : milligramme (10^{-3} Gramme)

min : minute
 mm : millimètre (10^{-3} mètre)
 mM : milliMolaire
 mL : millilitre (10^{-3} Litre)
 ML : Maximum de vraisemblance
 ms : molécule signal
 MS : Mass Spectrometry
 MOD : Matière organique dissoute
 MOP : Matière organique particulaire
 NCBI : National Center for Biotechnology Information
 NJ : Neighbour-Joining
 nm : nanomètre (10^{-9} mètre)
 nt : nucléotide
 OD : Optical Density
 ORF : Open Reading Frame
 OTU : Operational Taxonomic Unit
 3-OH PAME : 3-hydroxypalmitic acid methyl ester
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PQS : Pseudomonas Quinolone Signal
 pb : paire de bases
 pH : potentiel Hydrogène
 qPCR : PCR quantitative en temps réel
 QS : Quorum Sensing
 RFLP : Restriction Length Polymorphism
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 RNA : Ribonucleic Acid
 RT : Reverse Transcription
 rpm : rotations par minute
 SAH : S-AdénosylHomocystéine
 SAM : S-AdénosylMéthionine
 sp. : species
 SRH : S-RibosylHomoserine
 TDA : TropoDithietic Acid
 TIC : Total Ion Current
 T : Thymine
 TAE : tampon Tris Acétate EDTA
 Tris : Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane
 µL: Microlitre (10^{-6} Litre)
 µg : Microgramme (10^{-6} Gramme)
 µm : Micrometer (10^{-6} Mètre)
 µM : Micromolaire (10^{-6} Molaire)
 U : Uracil
 UFC : Unité Formant Colonie

Table des illustrations

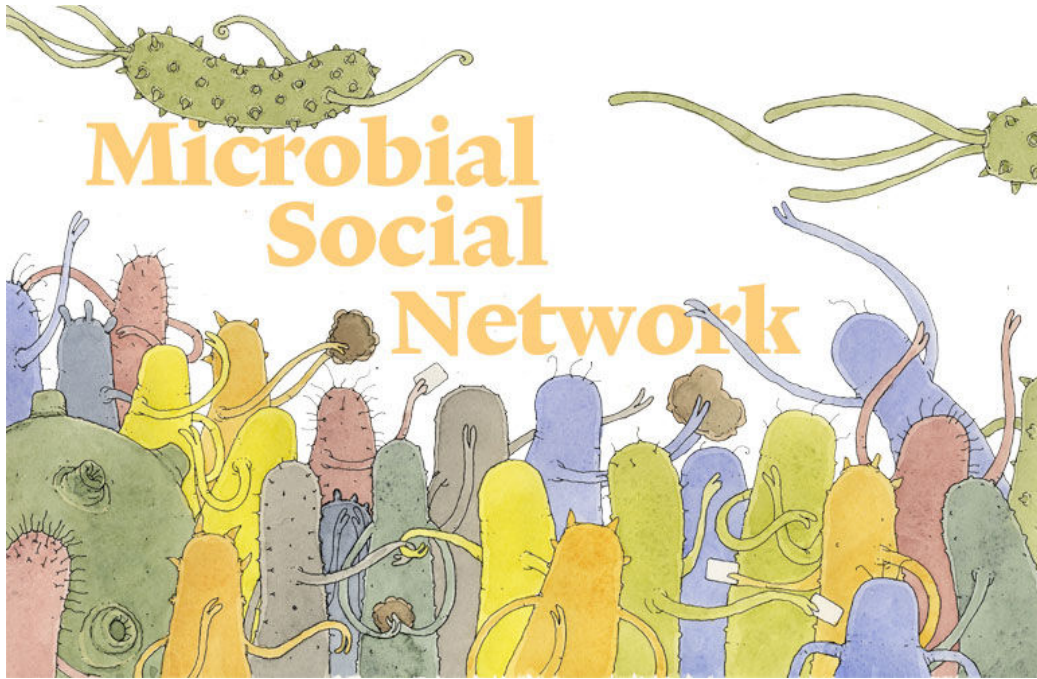
Figure 1 : Arbre phylogénétique du vivant.....	23
Figure 2 : Réseau trophique microbien marin et boucle microbienne	28
Figure 3 : Régulation de la bioluminescence chez <i>Vibrio fischeri</i> par le mécanisme de quorum sensing	32
Figure 4 : Fonctionnement du quorum sensing bactérien.....	34
Figure 5 : Exemples d'activités bactériennes régulées par les nombreuses voies du QS.....	39
Figure 6 : Structures moléculaires A) d'une acyl-homoserine-lactone classique B) de l'isovaleryl-homoserine, C) du p-coumaroyl-HSL et D) de l'aryl-HSL.....	41
Figure 7 : Etape-clé de la voie de biosynthèse des AHLs.	42
Figure 8 : Structures de l'AI-2.....	43
Figure 9 : Voie de biosynthèse de l'AI-2.	44
Figure 10 : Arbres phylogénétiques des gènes <i>luxI</i> à gauche et <i>luxR</i> à droite.	46
Figure 11 : Arbre phylogénétique en NJ des séquences protéiques de LuxS	47
Figure 12 : Structures moléculaires des CAI.....	48
Figure 13 : Structure moléculaire du 3-OH-PAME.....	49
Figure 14 : Structure moléculaire du PQS	49
Figure 15 : Structures moléculaires des DKPs.	50
Figure 16 : Structures moléculaires des DSFs	50
Figure 17 : Structure moléculaire du gamma-butyrolactone	51
Figure 18 : Structure moléculaire des AIPs	52
Figure 19 : Structure moléculaire de la Bradyoxetine.	53
Figure 20 : Structures moléculaires de l'indole (à gauche), de l'acide indole-3-acétique (au milieu) et tryptophane (à droite).	53
Figure 21 : Structures moléculaires de l'acide tropodithietique.....	54

Figure 22 : Temps de demi-vie des AHLs ou AI-1 dans les différents environnements alcalins (Horswill et al. 2006)	58
Figure 23: Exemples de molécules inhibitrices du quorum sensing (Zhang & Dong 2004)..	60
Figure 24 : Dégradation des AHLs par les enzymes acylases et lactonases (Zhang & Dong 2004).	61
Figure 25 : Possibles structures moléculaires de l'AHL carboxylée produite par les Archées (Zhang et al. 2012)	63
Figure 26 : Structures moléculaires du phényléthanol (à gauche), du farnesol (au centre) et du tryptophol (à droite)	64
Figure 27 : Phéromones produites par les Diatomées : ectocarpene, hormosirene, dictyopterene A, fucoserrantene et finavarrene (Amin et al. 2012).....	64
Figure 28 : Carte géographique du GOS. Les différentes stations de prélèvement sont représentées par les points rouges et verts.	75
Figure 29 : Comparaison des méthodes dépendantes et indépendantes des techniques de culture.	79
Figure 30 : Neighbour-Joining phylogenetic trees from <i>Maribius sp.</i> MOLA 401 sequences	101
Figure 31 : Geographic distribution of AI-1 (LuxI, HdtS and AinS-like sequences) and AI-2 (LuxS sequences) retrieved from the GOS metagenomes.	134
Figure 32 : Phylogenetic tree of annotated and environmental LuxI protein sequences.	136
Figure 33 : Phylogenetic tree of annotated and environmental HdtS protein sequences	140
Figure 34 : Phylogenetic tree of annotated and environmental LuxS protein sequences.	142
Figure 35 : Ditribution biogéographique des souches bactériennes marines positives pour la production d'AI-1.	163
Figure 36 : Courbe de croissance et test de la production d'AI-1 par SAR 11 <i>Pelagibacter ubique</i>	171
Figure 37 : Photographie du gel de migration des produits RT-Q-PCR amplifiés avec les amorces ciblant le <i>luxI</i> de <i>Roseobacter</i>	176
Figure 38 : Historical scale of the study of bioluminescence.	228
Figure 39 : Bioluminescent regulation in Dinoflagellate.....	242
Figure 40 : Quorum sensing induces bioluminescence in planktonic and symbiotic <i>Vibrios</i>	252

Table des Tableaux

Tableau 1 : Structures moléculaires et bactéries produisant les différentes molécules signal.	55
Tableau 2 : Comparaison des théories du quorum sensing, du Diffusing Sensing (DS) et de l'Efficiency Sensing (ES) (Alberghini et al. 2009).	67
Tableau 3 : ESI MS/MS spectra of AHLs, by fraction. The entries of this table correspond to the entries in table 2.	93
Tableau 4 : AHLs (R-C(O)-HSL) produced by <i>Maribius sp.</i> MOLA 401	96
Tableau 5 : Protein families and environmental sequences features.	134
Tableau 6 : Comparison of HdtS phylogenetic clusters abundances (in % of total sequences) in the FL and PA fractions over 8 GOS stations.	139
Tableau 7 : Correlation tests between sequencing effort or environmental variables and AI synthase abundance.	143
Tableau 8 : Souches bactériennes issues de la collection MOLA positives pour la production d'AI-1.	164
Tableau 9 : Nombre de séquences apparentées aux familles de gènes <i>ainS</i> , <i>hdtS</i> , <i>luxI</i> et <i>luxS</i> issues du métagénome et du métatranscriptome associé de la station d'observation de Plymouth.	170
Tableau 10 : Up-to-date list of traditionally recognized bioluminescent Dinoflagellates....	230
Tableau 11 : Up-to-date list of bioluminescent bacteria and their main life characteristics (Dunlap and Kita-Tsukamoto 2006; Haddock et al. 2010; McFall-Ngai 1999).	249
Tableau 12 : Diversité taxonomique des souches bactériennes possédant au moins un gène de la famille <i>luxI</i> dans leur génome et répertorié dans la base de données NCBI.	279
Tableau 13 : Diversité taxonomique des souches bactériennes possédant un gène de la famille <i>ainS</i> dans leur génome et répertorié dans la base de données NCBI	286
Tableau 14 : Diversité taxonomique des souches bactériennes possédant un gène de la famille <i>hdtS</i> dans leur génome et répertorié dans la base de données NCBI	287
Tableau 15 : Diversité taxonomique des souches bactériennes possédant un gène de la famille <i>luxS</i> dans leur génome et répertorié dans la base de données NCBI.	289
Tableau 16 : Exemples de voies du QS basées sur les familles de gènes <i>ainS</i> , <i>hdtS</i> et <i>luxI</i> et type d'AHLs produites	295
Tableau 17 : Souches bactériennes issues de la collection MOLA criblées pour l'émission d'AI-1. En rose les souches positives, en bleu les souches bioluminescentes.	301

Chapitre I : Introduction



<http://www.hhmi.org/bulletin/fall-2013/microbial-social-network> [http](http://www.hhmi.org/bulletin/fall-2013/microbial-social-network)

La communication inter-cellulaire chez les micro-organismes

Chapitre I : Introduction : La communication inter-cellulaire chez les micro-organismes

I-1 Les bactéries marines et leurs environnements

Dans son ensemble, le nombre de bactéries sur la planète Terre est estimé à environ 5×10^{30} cellules (Whitman et al. 1998). Les bactéries sont les organismes les plus étudiés dans le monde du vivant (**Figure 1**, arbre phylogénétique du vivant basé sur des génomes entièrement séquencés).

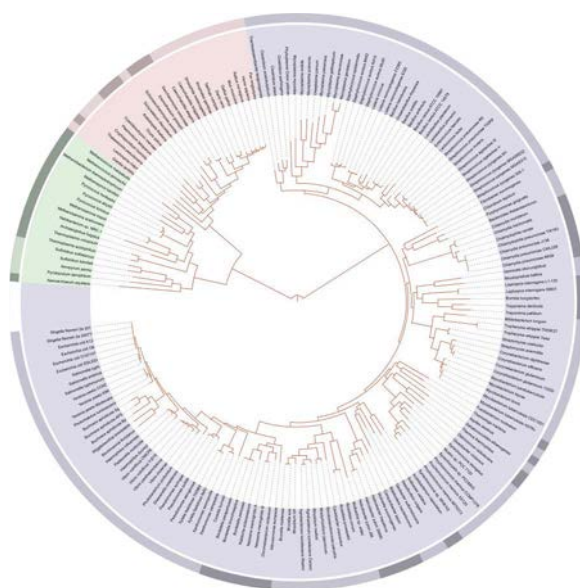


Figure 1 : Arbre phylogénétique du vivant

Arbre phylogénétique du vivant obtenu à partir des génomes entièrement séquencés jusqu'en 2006 issus de iTOF (Interactive Tree Of Life). En rose les eucaryotes, en vert les archées et en bleu les bactéries (Letunic & Bork 2007, 2011).

I-1-1 Les bactéries marines: quelle place dans l'environnement marin ?

Dans l'environnement marin, la concentration de bactéries est évaluée en moyenne à 5×10^5 cellules bactériennes par millilitre d'eau de mer, mais la répartition de ces cellules bactériennes est hétérogène. Il n'y a pas un seul mais plusieurs environnements marins, qui sont habités par des micro-organismes variés, tant sur le plan taxonomique que fonctionnel.

Les bactéries marines sont présentes de la surface des océans jusqu'au plancher océanique, de l'arctique à l'antarctique et dans toutes les mers et les océans du globe. Les bactéries marines ont donc une répartition géographique et spatiale ubiquiste. Elles présentent également une couverture taxonomique très large probablement liée à la pluralité de conditions environnementales rencontrées en milieu marin, par exemple la température de l'eau avoisine 1°C aux pôles et jusqu'à 350°C au niveau des fumeurs noirs des dorsales océaniques. Les bactéries ont donc une grande capacité d'adaptation, et vivent dans certaines niches où peu d'autres types d'organismes sont capables de vivre. Les données disponibles actuellement indiquent que le phylum des *Proteobacteria* (également appelé protéobactéries) dominerait les communautés bactériennes marines (Giovannoni & Rappé 2000). Les bactéries peuvent vivre librement dans la colonne d'eau (fraction libre), ou bien attachées à des particules (fraction attachée) mais également en association avec des animaux (Taylor et al. 2004, Mohamed et al. 2008, Tait et al. 2010), des algues, des végétaux, du plancton, du zooplancton (Cunliffe & Murrell 2009), sous forme de biofilm (Pasmore & Costerton 2003) adhérant à une surface inerte ou bien vivante (Cuadrado-Silva et al. 2013).

I-1-1-1 Les bactéries libres : la colonne d'eau

Le bactérioplancton désigne les bactéries qui vivent de manière libre dans la colonne d'eau. Ces dernières sont saprophytes, autotrophes ou encore chimiotrophes. Elles sont donc impliquées dans de nombreuses fonctions, comme la fixation de l'azote (Scavotto et al. 2015), la nitrification (Beman et al. 2012), et la méthanogénèse (Romesser et al. 1979). En milieu marin, le bactérioplancton participe fortement à la reminéralisation de la matière organique produite par le phytoplancton (Burkhardt 2013). Taxonomiquement, elles sont très diversifiées, même si les bactéries à gram négatif ou gram - dominent l'environnement planctonique (Glöckner et al. 1999). Certaines bactéries composant le bactérioplancton ont aussi au cours de leur cycle de vie, une phase où elles vivent attachées à des particules inertes ou non (Ghiglione et al. 2007, Crespo et al. 2013).

I-1-1-2 Les bactéries attachées : la neige marine

Les particules organiques et inorganiques en suspension dans la colonne d'eau et tombant vers le fond de l'océan sont également appelées neige marine (Alldredge & Silver 1988). Les bactéries vivant sur ces particules y trouveraient principalement une source de carbone (Simon 1990, Kiørboe et al. 2003). Celles ayant pour niche la neige marine

appartiendraient principalement aux classes *Gamma-Proteobacteria* et *Flavobacteriia* (Fontanez et al. 2015). La communauté bactérienne de la neige marine s'organise souvent sous forme de biofilm (Grossart et al. 2003) ce qui leur permet d'atteindre une abondance de 10^7 cellules bactériennes par sphère d'agar de 4 mm de diamètre (Kjørboe et al. 2003).

I-1-1-3 Les bactéries associées au phyto- et zoo- plancton

Le phytoplancton est composé de différents micro-organismes comme les diatomées, les dinoflagellés, les coccolithophoridés, des haptophytes, des cyanobactéries autotrophes... Il n'est présent que dans la couche euphotique de l'océan puisqu'il est photoautotrophe. Le phytoplancton vit en association avec un grand nombre de bactéries, qui se développent en formant un biofilm à leur surface (Wahl et al. 2012). Les données disponibles actuellement indiquent que la majorité des bactéries associées au phytoplancton et zooplancton font partie des classes *Flavobacteriia*, *Alpha-Proteobacteria* et *Gamma-Proteobacteria* (Heidelberg et al. 2002, Buchan et al. 2014). De plus, les déchets métaboliques excrétés par le phytoplancton dans le milieu extérieur et les pelotes faecales relarguées par le zooplancton (Turner 2015) rejoignent l'ensemble de particules de la neige marine qui sombrent vers le fond de l'océan.

I-1-1-4 La communauté bactérienne du sédiment

Le sédiment marin est composé de la matière organique et inorganique se déposant au fond de l'océan. Il comporte deux phases, une phase solide constituée de particules minérales et organiques ainsi qu'une phase liquide sous forme d'eau interstitielle. L'abondance des micro-organismes vivant dans le sédiment global avoisine $2,9 \times 10^{29}$ cellules (Kallmeyer et al. 2012), mais localement la densité bactérienne est de $1,7 \times 10^7$ cellules par millilitre (Carr et al. 2013). Ainsi, la biomasse de procaryotes vivant dans le premier centimètre du sédiment serait l'équivalent de celle d'une colonne d'eau d'une dizaine de mètres de hauteur. Le sédiment représente donc un vrai réacteur biogéochimique impliqué dans la minéralisation de la matière (Chamroux 1966). Compte tenu des données actuelles, la communauté bactérienne du sédiment serait dominée par les classes bactériennes suivantes: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, et *Acidobacteria* (Gray & Herwig 1996).

I-1-1-5 Les bactéries associées aux macro-algues

La communauté bactérienne se développant en tant qu'épiphyte ou endophyte sur les macro-algues telles que l'algue verte *Ulva sp.*, l'algue brune *Colpomenia*, l'algue rouge

Prionitis est très importante (Hollants et al. 2013). Les bactéries des clades *Gamma-Proteobacteria* (dont 10% de *Vibrionales*), CFB group, *Alpha-Proteobacteria* (dont 7% de *Rhodobacterales*), *Firmicutes*, et *Actinobacteria* seraient majoritairement présentes à la surface des algues. La densité bactérienne à la surface des algues est souvent proche de 10^7 cellules bactériennes par gramme d'algue sèche (Hollants et al. 2013). La communauté bactérienne vivant en association avec ces algues participent à leur défense face aux colonisateurs potentiels ainsi qu'aux pathogènes (Egan et al. 2013) et peuvent impacter leur développement morphologique (Singh & Reddy 2014), grâce à de nombreux métabolites secondaires produits (Martin et al. 2014).

I-1-1-6 Les bactéries associées aux plantes

Le thalle des angiospermes marines telles que les herbiers de posidonies (*Posidonia oceanica*) est également colonisé par de nombreux micro-organismes dont des bactéries appartenant aux classes des *Alpha- Beta- & Gamma-Proteobacteria*, ainsi qu'aux *Bacteroidetes* (Garcias-Bonet et al. 2012).

I-1-1-7 Les bactéries associées aux invertébrés marins

Le récif corallien est un écosystème marin parmi les plus diversifiés et productifs. La communauté bactérienne associée aux coraux est souvent importante et dominée par les bactéries des classes phylogénétiques *Gamma-Proteobacteria*, *Actinobacteria*, et *Firmicutes* (ElAhwany et al. 2015).

Les éponges marines sont colonisées par un grand nombre de bactéries qui appartiendraient aux classes des *Bacilli* et *Gamma-Proteobacteria* (Anand et al. 2006) mais aussi les *Actinobacteria*, bactéries gram positives ayant un faible pourcentage de bases G-C dans leur ADN, les *Cytophaga/Flavobacterium*, les bactéries vertes sulfurées, non sulfurées et les *Planctomycetes* (Webster et al. 2001). La densité bactérienne au sein d'une éponge peut atteindre 10^9 bactéries par gramme d'éponge (Hardoim et al. 2009).

Les crustacés comme les balanes sont souvent trouvés en association avec des bactéries issues des clades d'*Actinobacteria*, d'*Alpha-Proteobacteria*, de *Bacteroidetes* et de *Firmicutes* (Bacchetti De Gregoris et al. 2012). La communauté bactérienne vivant en association avec d'autres crustacés serait surtout composée de *Gamma-Proteobacteria*, d'*Actinobacteria*, de *Flavobacteriia* (Carman & Dobbs 1997).

I-1-1-8 Les bactéries associées aux vertébrés marins

Les vertébrés marins qu'il s'agisse de poissons, ou de mammifères ont des communautés bactériennes associées à leurs différents organes. Par exemple au niveau de la peau des baleines à bosses on retrouve principalement la *Flavobacteria* du genre *Tenacibaculum* et la *Gamma-Proteobacteria* du genre *Psychrobacter*. Cependant le reste de cette communauté bactérienne varie en fonction de plusieurs paramètres dont les saisons, les individus... (Apprill et al. 2014). La communauté bactérienne de la peau de certains poissons a été récemment caractérisée (Chiarello et al. 2015). Cette communauté bactérienne a également été étudiée dans le cadre des zoonoses des bactéries pathogènes des vertébrés marins comme l'*Alpha-Proteobacteria* du genre *Brucella spp.*, ou bien la *Spirochaetia* du genre *Leptospira spp* ou encore la *Gamma-Proteobacteria* du genre *Vibrio* ont donc été identifiées (Bogomolni et al. 2008).

La présence constante du phylum des *Proteobacteria* dans les divers écosystèmes marins abordés est remarquable, ainsi qu'une densité bactérienne locale élevée. Les bactéries, et d'une manière générale les micro-organismes marins ne vivent pas de manière isolée et indépendante, mais au contraire souvent en association avec d'autres êtres vivants. Les bactéries marines font donc partie intégrante de l'écosystème marin et sont impliquées dans le réseau trophique et les cycles biogéochimiques associés.

I-1-2 L'implication des bactéries marines dans le réseau trophique et les cycles biogéochimiques

La chaîne trophique de l'écosystème marin était considérée comme linéaire jusque dans les années 1970. Les producteurs primaires (phytoplancton) constituent une source d'alimentation pour le zooplancton, maillon trophique intermédiaire avec le haut de la chaîne (Poissons, Mammifères). Puis, la découverte de l'importance des bactéries marines (autrefois négligées) a conduit à la reconsidérer sous forme de réseau trophique (Pomeroy 1974). Enfin, la notion de boucle microbienne a émergé dans les années 1980 (Azam et al 1983). Le réseau trophique microbien marin, est constitué par des micro-organismes de nature auto- et hétérotrophe (Giovannoni & Stingl 2005). Il vient se brancher sur la chaîne trophique linéaire. Les micro-organismes majoritairement présents dans l'océan appartiennent au pico- et nano-plancton comme les cyanobactéries, les bactéries hétérotrophes et les flagellés (Seymour et al. 2009). La matière organique dissoute (MOD) et la matière organique particulaire (MOP)

jouent un rôle essentiel dans le réseau trophique microbien. En effet, elles constituent le support alimentaire pour le développement du réseau microbien et proviennent, en partie, de l'exudation phytoplanctonique et du zooplancton (Buchan et al. 2014) (**Figure 2**). La MOD est une source de substrats nécessaires pour la production bactérienne. La boucle microbienne (**Figure 2**) est définie à l'intérieur du réseau trophique microbien (Pomeroy et al. 2007) et elle est constituée d'organismes hétérotrophes : bactéries, flagellés, ciliés (Azam 1983) et les archées. La prédation des procaryotes par les flagellés hétérotrophes et par les ciliés, ainsi que celle des flagellés par les ciliés, produisent de la matière organique et permettent le recyclage de différents éléments nutritifs (ammonium, phosphore...) qui sont mobilisés pour la croissance bactérienne. Le flux de matière résultant des activités de micro-organismes autotrophes (Karl 2002) et hétérotrophes de différents réseaux trophiques sont acheminés vers les niveaux trophiques supérieurs. Deux voies sont possibles : la voie trophique autotrophe est basée sur l'activité des micro-organismes phototrophes des réseaux trophiques herbivores, tandis que la voie hétérotrophe repose sur l'activité des micro-organismes hétérotrophes de la boucle microbienne et du réseau trophique microbien, notamment les Ciliés et les Flagellés. Le zooplancton assure donc le lien essentiel entre les micro- et les macro-organismes grâce à sa place centrale, d'une part en tant que prédateur des procaryotes, et d'autre part en tant que proie des macro-organismes.

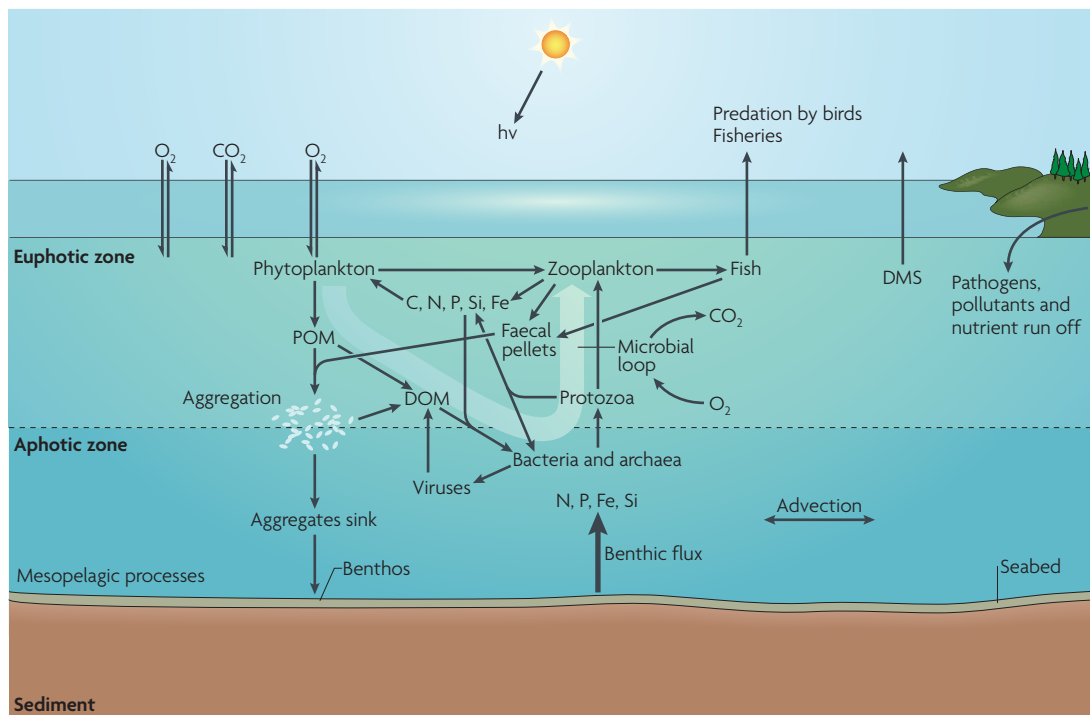


Figure 2 : Réseau trophique microbien marin et boucle microbienne

Représentation schématique du réseau trophique microbien marin et de la boucle microbienne, ainsi que certains éléments et une partie de leur cycle biogéochimique associé (Azam & Malfatti 2007).

Tous les éléments tels que le carbone, l'azote, le soufre, l'oxygène... ont un cycle biogéochimique qui leur permet de passer de l'état organique à inorganique et *vice versa* et de passer par les différents compartiments de la biosphère : pédosphère, hydrosphère et atmosphère. De part leur biomasse élevée et la diversité de leurs capacités métaboliques, les micro-organismes ont un rôle incontournable dans le fonctionnement des cycles biogéochimiques et donc dans celui des écosystèmes (Strom 2008). Dans la biosphère, ils sont à la fois producteurs, consommateurs et décomposeurs. Les micro-organismes interviennent dans toutes les étapes des cycles biogéochimiques (Pomeroy 1974) (**Figure 2**) grâce à leur importante diversité taxonomique et surtout fonctionnelle (Azam & Malfatti 2007). Comme nous venons de le détailler il existe de nombreuses interactions entre tous ces micro-organismes (biotique) et avec leur environnement (abiotique), ainsi l'étude de ces interactions a donné naissance à l'écologie microbienne

I-1-3 De l'écologie microbienne à l'écologie chimique

Les micro-organismes ont longtemps été étudiés comme des organismes solitaires, mais depuis quelques années la notion d'interaction microbienne a été introduite. En effet les microbiologistes sont arrivés à la conclusion que les micro-organismes ne fonctionnaient pas comme des entités uniques et séparées les unes des autres, mais bien en communauté, en "société" et qu'ils ne pouvaient pas vivre les uns sans les autres (Bertrand et al. 2011). Cette constatation a donné naissance à une discipline de la microbiologie dans les années 1960 : l'écologie microbienne (Bertrand et al. 2011). L'initiateur de cette discipline fut le chercheur russe Sergei Winogradsky (Dworkin & Gutnick 2012).

L'écologie microbienne est donc la discipline qui a pour but de comprendre les interactions entre les micro-organismes et avec leur environnement (Bertrand et al. 2011). La vie en communauté implique des interactions, dont la coordination et la nécessité de communiquer pour transmettre l'information. Il apparaît alors fondamental d'étudier la communication inter-cellulaire des sociétés microbiennes. Pour gérer leur communauté, certains micro-organismes ont mis en place, comme beaucoup d'autres organismes grégaires, des systèmes permettant d'échanger de l'information chimique de manière ponctuelle (Oleskin

et al. 2000). La transmission de messages est indispensable pour, par exemple, réguler la densité de leur population, ajuster la production de certains métabolites, synchroniser leur effort dans l'expression d'un phénotype... Pour communiquer, ces êtres microscopiques n'utilisent pas un langage sonore ou de gestuelle comme certains animaux (Owings & Morton 1998) mais un langage chimique (Schauder & Bassler 2001). Effectivement, les microbes sont dénués de cordes vocales mais sont très bien équipés pour produire et réceptionner une large gamme de molécules chimiques ! Etudier la communication au sein des communautés de micro-organismes nous amène à étudier l'écologie chimique de cette société microbienne.

L'écologie chimique peut être étudiée à plusieurs niveaux de l'échelle écologique : au niveau de l'individu, d'une population, d'une communauté, d'un écosystème, et enfin d'un biota. Des exemples de communication chimique sont connus dans tous les domaines du vivant (Archaea, Eucarya, Bacteria), mais elle a d'abord été abordée chez les animaux comme par exemple les poissons à la fin des années 1960 (Todd et al. 1967). L'écologie chimique au sens large est une discipline qui étudie les molécules chimiques servant de moyen d'interaction à des fins trophiques, de compétition, ou de communication entre différents organismes d'une même espèce ou d'espèces différentes (Eisner & Meinwald 1995). Elle se base donc sur l'émission et la réception de molécules signal (Mori 2013). Ces molécules signal répondent en partie à la définition d'hormone, qui est plus communément utilisée pour les organismes pluricellulaires (plantes et animaux) (Cope 1964). "Une hormone est une substance chimique sécrétée, agissant à distance sur des récepteurs spécifiques de cellules cibles. Elle transmet un message sous forme chimique et joue donc un rôle de messenger dans l'organisme" (Forêt 2006). Le terme de phéromone désigne les molécules signal servant de messenger entre individus, mais il est aussi utilisé pour décrire les messagers chimiques entre macro-organismes. Nous préférons ici le terme de molécule signal car les hormones sont libérées à l'intérieur d'un organisme, et les molécules signal des micro-organismes sont envoyées vers le milieu extérieur. Les molécules signal peuvent être émises dans diverses matrices telles que l'eau, l'air ou la terre, de manière continue ou ponctuelle. La communication entre les micro-organismes est basée sur l'échange de molécules chimiques entre cellules. Cette communication de cellule à cellule sous le contrôle du Quorum Sensing (QS), repose sur la densité cellulaire de la population et a été découverte chez les bactéries dans les années 1970.

I-2 Le quorum sensing : la communication bactérienne intercellulaire

L'art et la manière de transmettre l'information, de coopérer et de coordonner la communauté :

"l'union fait la force"

I-2-1 Historique : de l'étude de la bioluminescence à la découverte et la compréhension du mécanisme de quorum sensing

Le quorum sensing a été découvert dans les années 70 au cours de l'étude d'un phénomène fascinant, celui de la bioluminescence. Plus précisément, cette étude était consacrée à la production de bioluminescence par une bactérie marine, *Vibrio fischeri*, vivant en association avec une sépiole, *Euprymna scolopes* (Nealson et al. 1970). L'émission de bioluminescence permet à la seiche de se camoufler afin d'échapper à ses prédateurs en imitant le rayonnement lumineux du soleil et de la lune dans l'océan. Ce phénomène est appelé la contre-illumination (Jones & Nishiguchi 2004). Lorsque la bactérie *Vibrio fischeri* vit à l'état libre dans l'eau de mer au sein du bacterioplancton et qu'elle n'est pas en densité suffisante, elle n'émet pas de luminescence car la relativement faible quantité de molécules signal produites diffuse librement dans l'eau de mer. Par contre, lorsque la bactérie *Vibrio fischeri* colonise l'organe photophore de la seiche (Ruby 1996), elle se multiplie dans un espace restreint dans lequel on observe une proximité des cellules bactériennes qui lui permet d'arriver à la quantité seuil de cellules bactériennes dans la colonie et de déclencher l'expression des gènes impliqués dans la production de la bioluminescence (**Figure 3**). Chaque matin l'animal expulse une partie de la colonie bactérienne de *Vibrio fischeri*, pour éliminer les cellules bactériennes sénescents et éviter d'émettre de la lumière lorsqu'elle va se reposer au fond de l'océan (Visick et al. 2000). Elle ne conserve que 5 % des bactéries qui se multiplient jusqu'à ce que la colonie atteigne à nouveau le soir venu la quantité seuil de cellules permettant d'atteindre le quorum de molécules signal. L'expression des gènes de l'opéron *LuxCDABE* est alors activée et les bactéries émettent simultanément de la lumière (Hastings & Greenberg 1999) (**Figure 3**). C'est le confinement des bactéries dans l'organe de la sépiole, limitant la diffusion des molécules signal bactériennes dans le milieu extérieur qui permet d'atteindre rapidement le quorum (ou concentration seuil) de cellules bactériennes et de molécules signal nécessaires à l'activation de l'opéron *lux*. Cette première molécule signal bactérienne a été nommée Autoinducteur de type 1 (AI-1). Elle a été mise en évidence chez une bactérie à gram négatif et identifiée en 1981 comme étant une acyl-homoserine lactone

(Eberhard et al. 1981). Puis en 1984, c'est le gène codant la principale enzyme de la voie de biosynthèse de cette molécule qui a été mis en évidence (Engelbrecht et al. 1983, Engelbrecht & Silverman 1984). Enfin, en 1994, le nom de quorum sensing apparaît pour la première fois (Fuqua et al. 1994). Depuis, d'autres types de molécules signal impliquées dans le mécanisme de quorum sensing ont été mis en évidence chez des bactéries à gram négatif et positif (Krumphanzl 1982, Håvarstein et al. 1995). Le quorum sensing apparaît comme une caractéristique répandue dans le règne des bactéries.

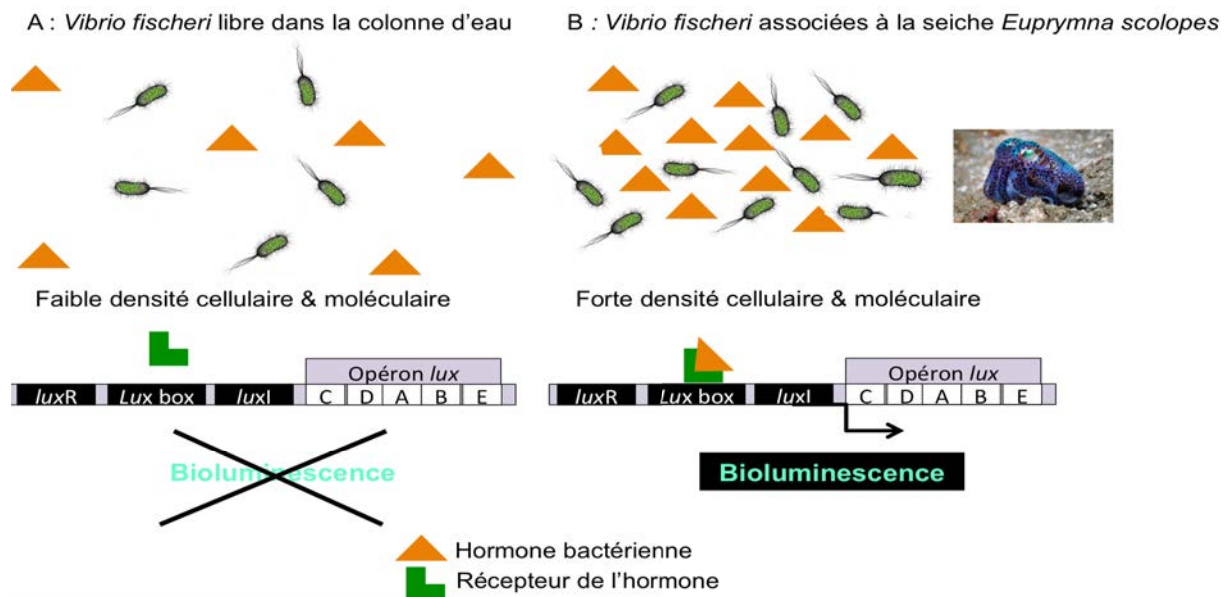


Figure 3 : Régulation de la bioluminescence chez *Vibrio fischeri* par le mécanisme de quorum sensing.

A: Quand la colonie bactérienne contient une faible densité cellulaire les molécules signal qu'elle émet ne sont également pas en quantité suffisante et les gènes impliqués dans l'expression de la bioluminescence ne sont donc pas activés. **B:** Lorsque la bactérie vit en association symbiotique dans les photophores de la seiche *Euprymna scolopes* les molécules signal s'accumulent dans le milieu proche de la colonie bactérienne ce qui favorise leur reconnaissance par leur récepteur, puis l'activation des gènes impliqués dans la production de luminescence.

I-2-2 Le mécanisme général du quorum sensing bactérien

Le quorum sensing ou QS est un mécanisme de signalisation inter-cellulaire favorisant la coopération bactérienne intra et inter-spécifique (McKenney et al. 1995, Pierson et al. 1998). Ce mécanisme moléculaire permet aux bactéries de communiquer entre elles via des molécules dites signal. Ces dernières sont synthétisées grâce à des enzymes. Ce système

repose sur la densité de cellules bactériennes présentes dans la colonie et sur la quantité de molécules signal présentes dans l'environnement proche de ces bactéries (Miller & Bassler 2001). La quantité de molécules signal est directement liée au nombre de cellules bactériennes dans la colonie (**Figure 4**) ainsi qu'à la conformation de l'environnement où elles se situent (Ramsey et al. 2009). Lorsque la densité bactérienne de la colonie augmente, la concentration de molécules signal augmente par voie de conséquence, jusqu'à atteindre un certain seuil ou quorum, à partir duquel l'activité bactérienne en question est activée ou bien réprimée selon le cas (Waters & Bassler 2005). Certains phénotypes bactériens gouvernés par le mécanisme de QS sont donc dépendants de la densité cellulaire de la population ainsi que de la concentration en molécule signal. En effet, lorsque les molécules signal sont en quantité suffisante, elles se lient à leur récepteur protéique intracellulaire et l'ensemble se comporte en facteurs de transcription, en se fixant à l'ADN pour réguler les gènes ciblés (**Figure 4**). De plus, dans le cas de l'Auto-inducteur de type 1, ceci entraîne une surproduction de molécules signal (boucle de rétro-action positive) (**Figure 4**) ayant pour effet d'amplifier le phénomène (d'où le nom d'auto-inducteur également donné à cette molécule signal) (Fuqua & Greenberg 2002). Mais cette boucle de rétro-action n'est présente que dans le mécanisme de QS basé sur les AI-1.

Un endroit confiné favorise l'augmentation de la concentration en molécules signal alors qu'un milieu ouvert favorise leur diffusion ne permettant pas d'atteindre le quorum (Redfield 2002, Hense et al. 2007). Ces molécules signal sont produites et détectées à de faibles concentrations (entre 1 pmol et 1 μ mol) par les bactéries. Un grand nombre de bactéries possèdent plusieurs voies de QS qui sont souvent interconnectées (Edwards et al. 2009, Henke & Bassler 2004, Jimenez et al. 2012, Berger et al. 2011). Ce système coordonne et synchronise l'expression d'une multitude d'activités bactériennes au sein de la communauté comme par exemple la formation de biofilm, la nodulation, l'émission de bioluminescence, la production de facteur de virulence, la mobilité, le transfert d'ADN, la production de produits extracellulaires (Diggle et al. 2007). La population bactérienne agit donc ainsi dans un intérêt commun (Crespi 2001, Stevens et al. 2012, Papat et al. 2015). De plus le QS permettrait également aux bactéries de vérifier la présence d'un nombre suffisant de cellules dans la colonie afin que l'expression d'une activité bactérienne coûteuse en énergie comme celles citées ci-dessus ne soit pas vaine, et que son impact soit maximisé (Diggle et al. 2007).

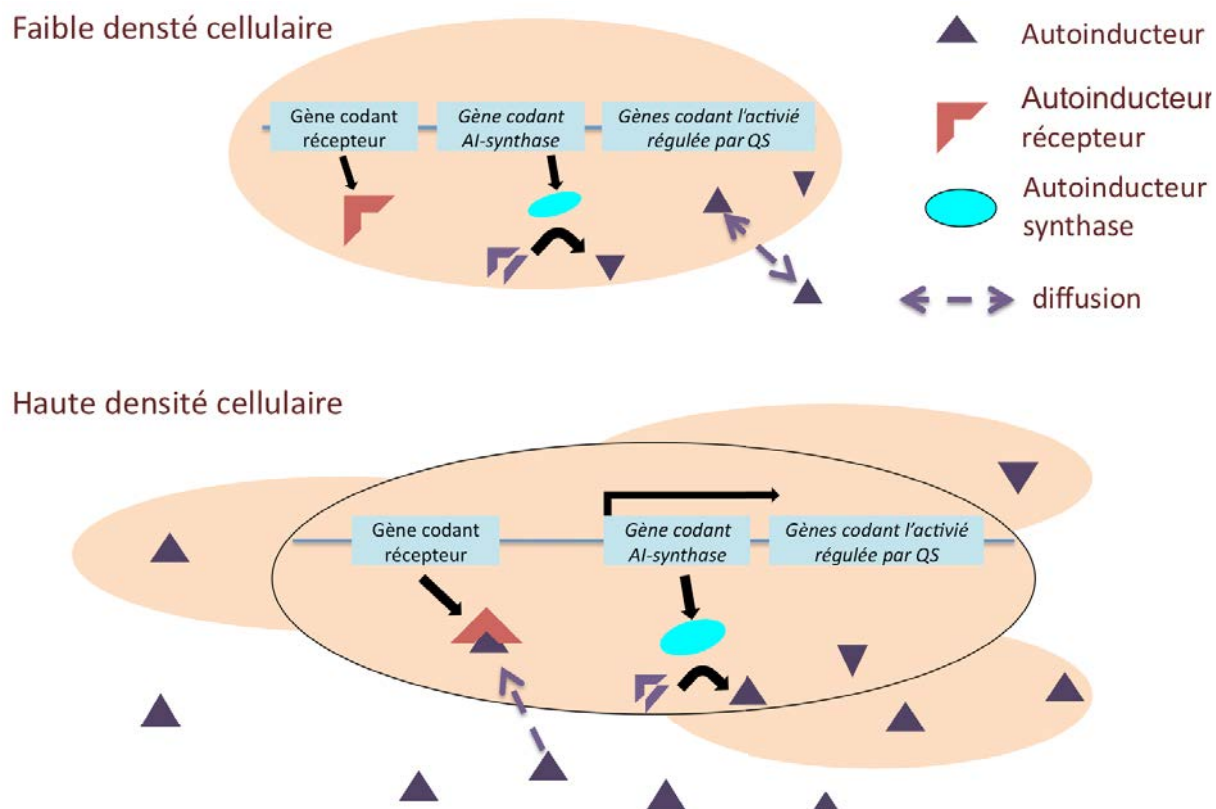


Figure 4 : Fonctionnement du quorum sensing bactérien.

La régulation de l'activité bactérienne contrôlée par le QS est basée sur la densité cellulaire et la concentration en molécule signal. Une quantité cellulaire suffisante doit être atteinte (notion de quorum) pour que la concentration en molécule signal soit suffisamment importante et déclenche l'activation ou la répression du phénotype bactérien.

I-2-3 Les phénotypes régulés par quorum sensing chez les bactéries

La communication entre bactéries permet aux populations bactériennes de coordonner leurs réponses, d'agir comme un organisme pluri-cellulaire (Shapiro 1998, Waters & Bassler 2005) ce qui leur confère un avantage écologique lorsqu'il s'agit d'utiliser des sources nutritives complexes, d'accéder à certaines niches écologiques et de se défendre (Case et al. 2008). Le QS permet la régulation et la synchronisation de nombreuses activités bactériennes (**Figure 5**) (Eberl 1999, Diggle et al. 2007). Certaines sont présentées ci-après :

I-2-3-1 La nodulation

La nodulation est la formation de nodules ou boursouflures au niveau des racines de certaines plantes (**Figure 5**). Ces nodules contiennent de bactéries du genre *Rhizobium* qui vivent en symbiose avec la plante et qui lui permettent d'avoir accès à de l'azote sous forme de

NH₄⁺. La mise en place de ces nodules est directement liée à la densité de cellules bactériennes présentes dans le sol. Cette activité est régulée par les acyl-homoserine lactones ou AI-1 (Yang et al. 2009) et la bradyoxetine ou CDF (Jitackorn & Sadowsky 2008). Ce type de phénomène n'a jamais été observé dans l'environnement marin.

I-2-3-2 Les facteurs de virulence

La production de facteurs de virulence est gérée par le mécanisme de QS chez plusieurs bactéries gram - et gram + telles que *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (**Figure 5**). Ce mécanisme permet à ces dernières de maximiser leur impact vis à vis de leur hôte, de leur agresseur. Les molécules signal impliquées dans la régulation de ce processus sont respectivement l'AI-1, le PQS (Pseudomonas Quinolone Signal), le PAME (3-hydroxy Palmitic Acid Methyl Ester) (Flavier et al. 1997), et enfin l'AIP (Auto-Inducing Peptide) pour les bactéries gram + (Flavier et al. 1997, Rutherford & Bassler 2012). Chez les bactéries marines appartenant au genre *Vibrio* la régulation de l'expression de facteurs de virulence par le QS a clairement été établie (Milton et al. 1997, 2001, 2006).

I-2-3-3 La mobilité bactérienne

Le QS régule aussi la mobilité bactérienne, qui comporte deux types : la nage et l'essaimage. La mobilité bactérienne (**Figure 5**) est possible grâce d'une part, à la présence de flagelles et d'autre part, à la sécrétion de bio-surfactants permettant la diminution de la tension de surface, qui sont régulés par le mécanisme de QS (Zan et al. 2015b). La construction d'un flagelle est basée sur la voie de QS reposant sur les AI-1, alors que celle de biosurfactants dépend des AI-2 (Auto-inducteur type 2) (Daniels et al. 2004). Ces deux activités sont également liées à la formation du biofilm puisqu'elles permettent la colonisation d'une surface par les bactéries (Nickzad et al. 2015). Par exemple, la mobilité bactérienne est contrôlée par le QS chez la bactérie du genre *Yersinia* (**Figure 5**) connue pour sa grande pathogénicité (Atkinson et al. 2006). En milieu marin, la régulation de la mobilité bactérienne a été mise en évidence chez la bactérie du genre *Ruegeria*, qui vit en association avec une éponge (Zan et al. 2015b).

I-2-3-4 La fructification

La fructification est une activité bactérienne décrite chez la *Delta-Proteobacteria* du sol *Myxococcus xanthus*, et consiste en la formation d'un corps de fructification (**Figure 5**) en réponse à un manque de nutriments dans le milieu. Le corps de fructification est formé par l'agrégation de plusieurs cellules bactériennes et porte des spores. Plusieurs signaux protéiques nommés A, B, C, D et E seraient impliqués dans ce processus, seuls les signaux A et C ont été caractérisés (Kaiser 2004, Konovalova et al. 2012). Ce phénotype et sa régulation par QS n'ont pas encore été explorés dans l'environnement marin.

I-2-3-5 Le transfert d'ADN

Chez les bactéries, trois modes de transfert d'ADN (**Figure 5**) sont connus : la conjugaison ou transfert d'ADN entre bactéries (Schaefer et al. 2002), la transformation ou intégration d'ADN présent dans l'environnement par une bactérie et enfin la transduction où le transfert d'ADN est réalisé par un phage. Les deux premières catégories sont connues pour être régulées par le QS.

L'exemple le plus connu de conjugaison bactérienne est celui d'*Agrobacterium tumefaciens* une bactérie pathogène de plante qui induit la formation d'une tumeur au niveau du collet de la plante. La bactérie transfère son plasmide Ti aux cellules de la plante, et c'est l'expression des gènes portés par ce plasmide qui favorise la formation de la tumeur. Ce plasmide comporte notamment deux gènes, *traI* qui code une AI-1 synthase et *traR* qui code le récepteur à l'AI-1 (White & Winans 2007). Le transfert d'ADN est aussi géré par le mécanisme de QS basé sur les AI-1 chez la bactérie marine *Rhodobacter capsulatus* (Schaefer et al. 2002)

La transformation bactérienne a été bien caractérisée chez *Streptococcus pneumoniae* chez qui l'accumulation de l'AIP (Auto-Inducing Peptide) permet l'activation des gènes impliqués dans la compétence bactérienne (Pestova et al. 1996, Lee & Morrison 1999).

I-2-3-6 Les biofilms

Les bactéries peuvent vivre de manière libre ou bien attachées à des surfaces où elles peuvent former un biofilm (**Figure 5**). Celui-ci est constitué d'une matrice extracellulaire produite par les bactéries elles-mêmes et qui leur confère une protection face aux agressions extérieures (organismes bactériovores, molécules antibactériennes...). La construction et

l'inhibition de ce biofilm sont régulées par le QS basé sur les AI-1 (Dickschat 2010). Une des bactéries les plus étudiées pour la formation de biofilm est *Pseudomonas aeruginosa*, qui est responsable d'infection nosocomiales récalcitrante en milieu hospitalier (Høiby et al. 2010). La formation de biofilms a aussi été mise en évidence chez des bactéries marine de la famille des *Rhodobacteraceae* (Elifantz et al. 2013). De plus la formation de biofilms régulés par QS en milieu marin est souvent la première étape du phénomène de "biofouling" ou colonisation des surfaces par des micro-organismes et des macro-organismes (Dobretsov et al. 2009).

I-2-3-7 Les produits extracellulaires

Le QS contrôle la production de différents produits extracellulaires tels que des enzymes, toxines, antibiotiques, sidérophores, pigments... Ceci a été bien caractérisé chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Schuster et al. 2003).

La régulation de la production de pigments par le QS basé sur les AHLs ou AI-1 a été mise en évidence chez la bactérie *Chromobacterium violaceum* (McClellan et al. 1997). Et également chez la bactérie marine *Phaeobacter gallaeciensis* (Berger et al. 2011).

La synthèse d'antibiotiques est contrôlée par le QS basé sur les AHLs chez les bactéries des genres *Burkholderia* qui produit des phénazines (Duerkop et al. 2009), *Serratia* qui produit la pyrrolnitrine (Liu et al. 2007), *Erwinia* qui synthétise un carbapenem (Bainton et al. 1992) et enfin chez la bactérie du sol gram + *Streptomyces* dont l'activité est gérée par le GBL (Gamma Butyrolactone). De plus la bactérie marine *Phaeobacter gallaeciensis* (famille des *Rhodobacteraceae*) régule la production d'acide tropodithiétique ou TDA grâce au mécanisme de QS basé sur les AI-1 (Berger et al. 2011).

I-2-3-8 L'incorporation du phosphore

Le QS basé sur les AI-1 et AI-2 régule l'acquisition du phosphore par les cyanobactéries marines grâce à leurs bactéries associées à partir du DOP (Dissolved Organic Phosphorus) présent dans l'environnement marin. En effet les AI-1 favoriseraient l'activité ATPase et donc l'incorporation du phosphore alors que l'AI-2 limiterait cette activité (Van Mooy et al. 2012).

I-2-3-9 La morphologie cellulaire

La morphologie des cellules de *Dinoroseobacter shibae* une bactérie marine membre de la famille des *Rhodobacteraceae* et vivant en association avec un dinoflagellé (algue unicellulaire), est sous l'influence des AHLs. En effet, lorsque la bactérie ne peut plus produire d'AHL sa morphologie est constante alors que lorsqu'elle en produit elle peut prendre différentes formes en fonction de son environnement (Patzelt et al. 2013).

I-2-3-10 La bioluminescence

L'étude de l'émission de bioluminescence (**Figure 5**) par les bactéries marines a permis la découverte et la compréhension du QS (voir la partie I-2-1). La bioluminescence est produite grâce à une réaction chimique impliquant une enzyme et son substrat. Le QS active la transcription de la voie de biosynthèse du substrat, la luciférine ainsi que la synthèse de l'enzyme intervenant dans cette réaction biochimique, la luciférase (Meighen 1991, 1993, Meighen & Dunlap 1993). La bioluminescence bactérienne a été mise en évidence chez les bactéries membres de la famille des *Vibrionaceae* et est contrôlée par le QS basé sur les AI-1 et -2 (Mok et al. 2003). Parmi les manifestations les plus spectaculaires, les "Milky seas" sont d'immenses formes bioluminescentes apparaissant à la surface de l'océan. Elles sont si gigantesques (environ 15000 km²) qu'elles sont visibles depuis l'espace (Miller et al. 2005, 2006). Parmi les microorganismes marins, la bioluminescence n'est pas produite que par les bactéries. En effet, des organismes eucaryotes, tels que les radiolaires et les dinoflagellés, sont des micro-organismes capables d'émettre de la lumière. En particulier, des études approfondies ont permis de mieux comprendre ce phénomène et ont montré que la production et la régulation de la bioluminescence chez les dinoflagellés diffèrent fortement de celles observées chez les bactéries (Valiadi & Iglesias-Rodriguez 2013) ; Doberva et al., submitted).

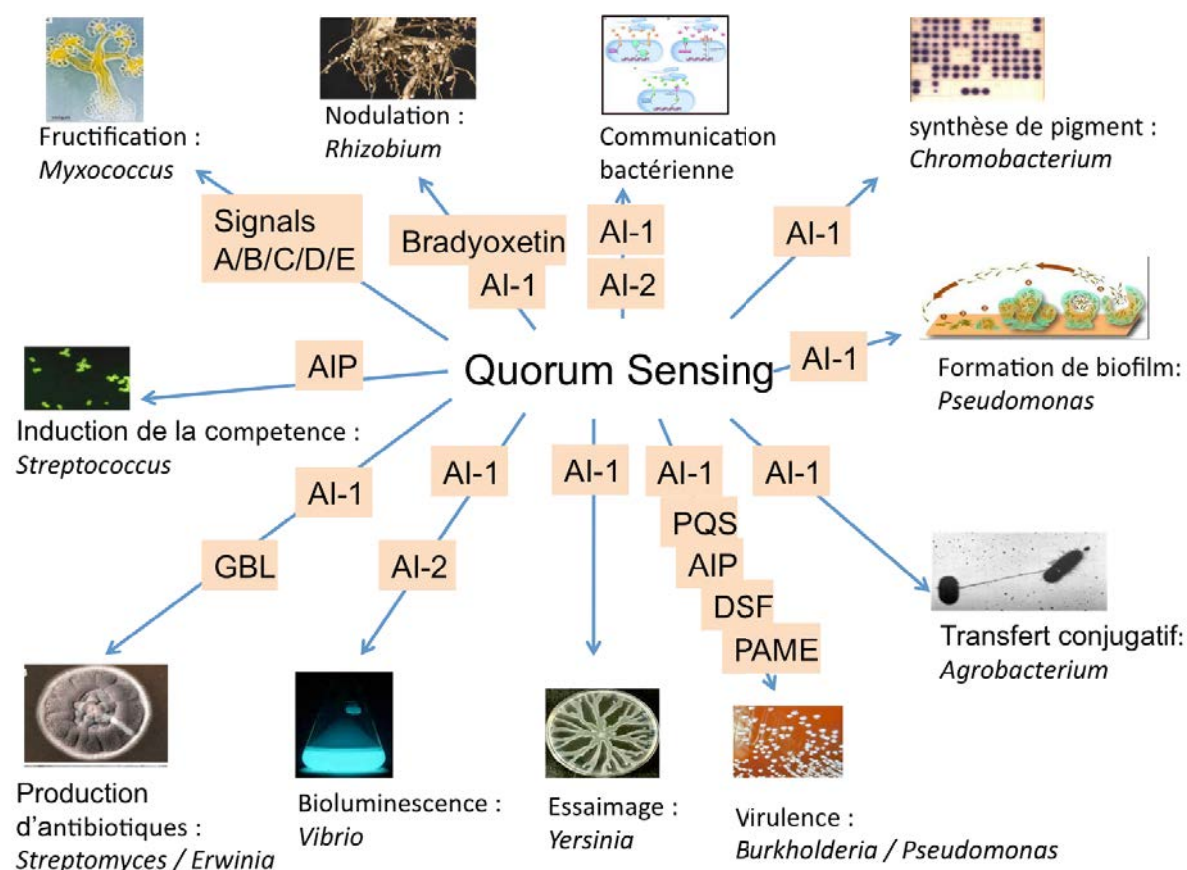


Figure 5 : Exemples d'activités bactériennes régulées par les nombreuses voies du QS. Cette liste est non exhaustive, et régulièrement de nouvelles activités contrôlées par ce mécanisme sont découvertes chez des souches bactériennes.

D'une manière générale, les fonctions bactériennes régulées par QS sont mises en évidence grâce à des expérimentations inactivant le gène codant l'enzyme-clé nécessaire à la synthèse de la molécule signal, et en analysant les différences de phénotypes entre la souche sauvage et la souche ayant le gène inactivé (souche mutante). Au final toutes ces activités bactériennes sont régulées par les mécanismes de QS, et ceci grâce à plusieurs molécules signal qui servent de médiateurs chimiques pour la coordination des bactéries vivant dans une même communauté.

I-2-4 Les molécules signal chez les bactéries

Le QS est basé sur l'émission, la réception et l'interconnexion de signaux moléculaires. Les voies de biosynthèse et les structures moléculaires de ces signaux varient selon les bactéries (**Tableau 1**). Certaines sont reconnues de manière inter-spécifique et d'autres intra-spécifique (Atkinson & Williams 2009). Les signaux moléculaires impliqués dans les

mécanismes de QS ont pour caractéristique d'être synthétisés et émis par les bactéries dans le milieu extérieur, et de s'y accumuler. Ils ont la capacité d'être reconnus par un récepteur intracellulaire ou membranaire (système à deux composants) d'une bactérie de même espèce ou d'une espèce différente (Keller & Surette 2006).

I-2-4-1 Les Auto-Inducteurs de types 1 et 2 : molécules et gènes codant les voies de biosynthèse

I-2-4-1-1 Les Auto-Inducteurs de type 1 (AI-1)

Les acyl-HomoSérine-Lactones ou AHLs sont les Auto-Inducteurs de type 1 (AI-1). Ces molécules sont composées d'une chaîne acyle comptant de 4 à 18 carbones (Williams et al. 2007), d'une homosérine et d'un cycle lactone (Eberhard et al. 1981), et elles peuvent posséder une substitution hydroxy ou oxy ou hydronégative sur le carbone 3 (**Figure 6**). Il existe aussi des variants des AHLs, comme le p-coumaroyl-HSL (Schaefer et al. 2008), le cinnamoyl-homoserine lactone ou aryl-HSL (Ahlgren et al. 2011) et l'isovaleryl-homoserine lactone (Lindemann et al. 2011).

A ce jour les AI-1 ou AHLs sont produites et détectées principalement par des bactéries gram - appartenant au phylum *Proteobacteria* (des classes *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Delta* et *Epsilon*) (Galloway et al. 2011). Néanmoins, une étude basée sur un gène partiel dont la séquence est proche du gène *luxI* prétend qu'une bactérie gram + en serait également capable, mais la caractérisation chimique de l'AI-1 n'a pas été obtenue (Biswa & Doble 2013). Le QS basé sur les AHLs a également été mis en évidence chez les cyanobactéries. En effet, un premier travail (Bachofen & Schenk 1998) a supputé leur production par les cyanobactéries et deux autres études ont validé ce fait (Sharif et al. 2008, Zhai et al. 2012).

Les AHLs à chaîne courte (plus hydrophiles) diffusent à travers l'enveloppe bactérienne et les AHLs à chaîne longue (plus hydrophobes) sont émises de manière active par la cellule bactérienne (Pearson et al. 1999), et elles s'accumulent dans le milieu extérieur (Fuqua & Greenberg 2002). Les récepteurs des AHLs sont codés par des gènes orthologues appartenant à la famille des *luxR*, et ils sont intracellulaires. Les AHLs sont efficaces à des concentrations très faibles autour de 0,1 à 400 nM (Kaplan & Greenberg 1985, Schaefer et al. 2002, Burton et al. 2005).

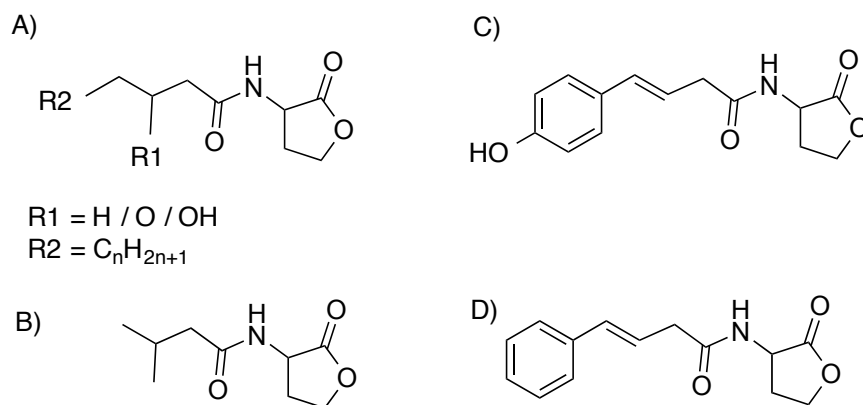


Figure 6 : Structures moléculaires A) d'une acyl-homoserine-lactone classique B) de l'isovaleryl-homoserine, C) du p-coumaroyl-HSL et D) de l'aryl-HSL.

L'enzyme-clé de la voie de biosynthèse des AHLs est l'AHL synthase. Cette enzyme est codée par les trois familles de gènes *luxI*, *ainS* et *hdtS* (Fuqua & Greenberg 2002). La diversité taxonomique des familles de gènes *luxI*, *ainS* et *hdtS* s'étend chez l'ensemble des protéobactéries (tableaux annexes 12 à 14). De plus, les noms des séquences des gènes composant les familles de gènes *luxI*, *ainS* et *hdtS*, les phénotypes et les souches bactériennes associées ne sont pas homogénéisés et dépendent des différentes études dont ils sont issus (tableau annexe 16). Il est clair que les liens entre les gènes codant les AHL synthases, les AHLs produites et les phénotypes régulés ne sont pas faciles à établir (tableau annexe 16). Cependant, ce point clé de la voie de biosynthèse a été élucidée pour les AHL-synthases de la famille LuxI. L'AHL synthase catalyse la liaison amide entre la chaîne d'acide gras portée par une protéine possédant un groupement acyle (ACP) et le groupe aminé d'une S-adenosyl méthionine (SAM), la lactonisation de la molécule s'effectuant ensuite avec le détachement de la 5'-méthylthioadénosine (Keller & Surette 2006) (**Figure 7**).

Il n'y a pas de lien spécifique entre le type de gène *luxI* codant l'AHL synthase et la diversité des AHLs produites observables. Un gène de la famille des *luxI* code une AHL synthase qui peut produire plusieurs AHLs différentes (variation dans la longueur de la chaîne acyle et dans la présence ou non de substitutions en C3) et une même AHL peut être produite par plusieurs AHL synthases différentes codées par différents gènes des familles *luxI*, *luxM* ou encore *hdtS* (Atkinson & Williams 2009). Ainsi, une même bactérie peut synthétiser des AHLs avec différentes longueurs de chaîne acyle et ne posséder qu'un seul gène codant l'AHL synthase. Par ailleurs, un grand nombre de bactéries possèdent plusieurs voies de QS LuxR/LuxI/AHL (tableau annexe 16) qui sont souvent interconnectées (Schaefer et al. 2013).

Cependant, certaines bactéries possèdent plus de gènes *luxR* que de gènes *luxI* dans leur génome, alors que d'autres, ne possèdent que le gène *luxR* (Case et al. 2008). Ces dernières sont qualifiées de "tricheuses" pour le QS car elles reçoivent les messages véhiculés par les AI-1 mais ne participent pas activement à cette communication bactérienne (Hudaiberdiev et al. 2015). Par exemple la bactérie *Escherichia coli* possède le gène *sdiA* qui est un homologue de *luxR* mais elle ne possède pas de *luxI*. La fixation d'AI-1 sur la protéine réceptrice SdiA régule négativement la production de certains facteurs de virulence chez cette bactérie (Kanamaru et al. 2000).

La nature et la production des AHLs émises dépendent également des substrats carbonés présents dans le milieu et utilisables par les bactéries. Par exemple la bactérie méthylotrophe *Methylobacterium extorquens* AM1 produit des AHLs uniquement quand elle pousse dans des conditions méthylophes (Nieto Penalver et al. 2006).

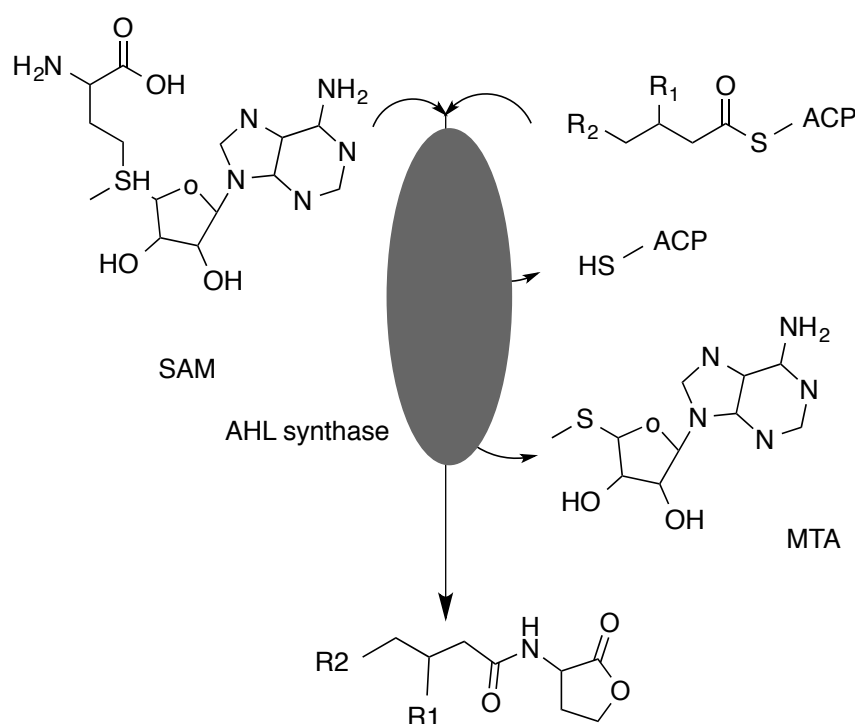


Figure 7 : Etape-clé de la voie de biosynthèse des AHLs.

L'AHL synthase catalyse la liaison amide entre la chaîne d'acide gras portée l'ACP et le groupe aminé d'une S-adenosyl méthionine (SAM), puis la lactonisation de la molécule s'effectue avec le détachement de la 5'-méthylthioadénosine.

Depuis la découverte de la voie des AI-1 beaucoup d'autres molécules de communication bactérienne ont été découvertes. Ces autres molécules sont issues d'autres voies métaboliques.

I-2-4-1-2 L'Auto-Inducteur de type 2 (AI-2)

L'Auto-Inducteur de type 2 a été identifié plus récemment, et permet une communication entre les bactéries gram - et + (Schauder et al. 2001). A ce jour on en connaît deux formes, celle isolée de *Vibrio harveyi* (2S,4S)-2-méthyl-2,3, 3,4-tetrahydroxy - tetrahydrofuran-borate (S-THMF-borate) également nommé furanosyl diester borate (Chen et al. 2002) et celle isolée de *Salmonella typhimurium* (2R,4S)-2-méthyl-2,3, 3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran (R-THMF) (Winzer et al. 2002, Miller et al. 2004) (**Figure 8**). L'enzyme-clé dans la synthèse de l'AI-2 est codée par la famille de gènes *luxS* (Surette et al. 1999) (tableau annexe 15 diversité taxonomique du gène *luxS*). L'enzyme LuxS catalyse le clivage de l'homocystéine à partir de la SRH, ce qui donne le précurseur de l'AI-2 : le DPD (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione) qui réalise une réaction de cyclisation spontanée (**Figure 9**) (Bassler 2002). L'AI-2 produit par *Salmonella typhimurium* peut subir des modifications post-transcriptionnelles et est transporté à travers la membrane cytoplasmique. Le récepteur de l'AI-2 chez *Vibrio harveyi* est un système à deux composants LuxP et LuxQ. LuxP est le récepteur membranaire et LuxQ contient une kinase. LuxQ transfère un phosphate à LuxU qui phosphoryle à son tour LuxO et ce dernier active les gènes cibles, mais cette voie de réception n'a été mise en évidence que chez le genre *Vibrio* (Sun et al. 2004). Chez le genre *Salmonella* l'AI-2 est perçu grâce à un transporteur ABC nommé Lsr, qui phosphoryle la molécule signal (Xavier et al. 2007). Cette dernière va alors se lier au régulateur transcriptionnel LsrD qui active l'opéron régulé (Taga et al. 2001, Xavier et al. 2007).

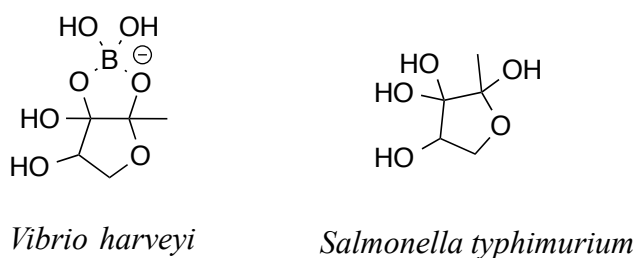


Figure 8 : Structures de l'AI-2.

A gauche, le (2S,4S)-2-méthyl-2,3, 3,4-tetrahydroxy-tetrahydrofuran-borate (S-THMF-borate) isolé chez *Vibrio harveyi*. A droite, le (2R,4S)-2-méthyl-2,3, 3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran (R-THMF) isolé chez *Salmonella typhimurium*.

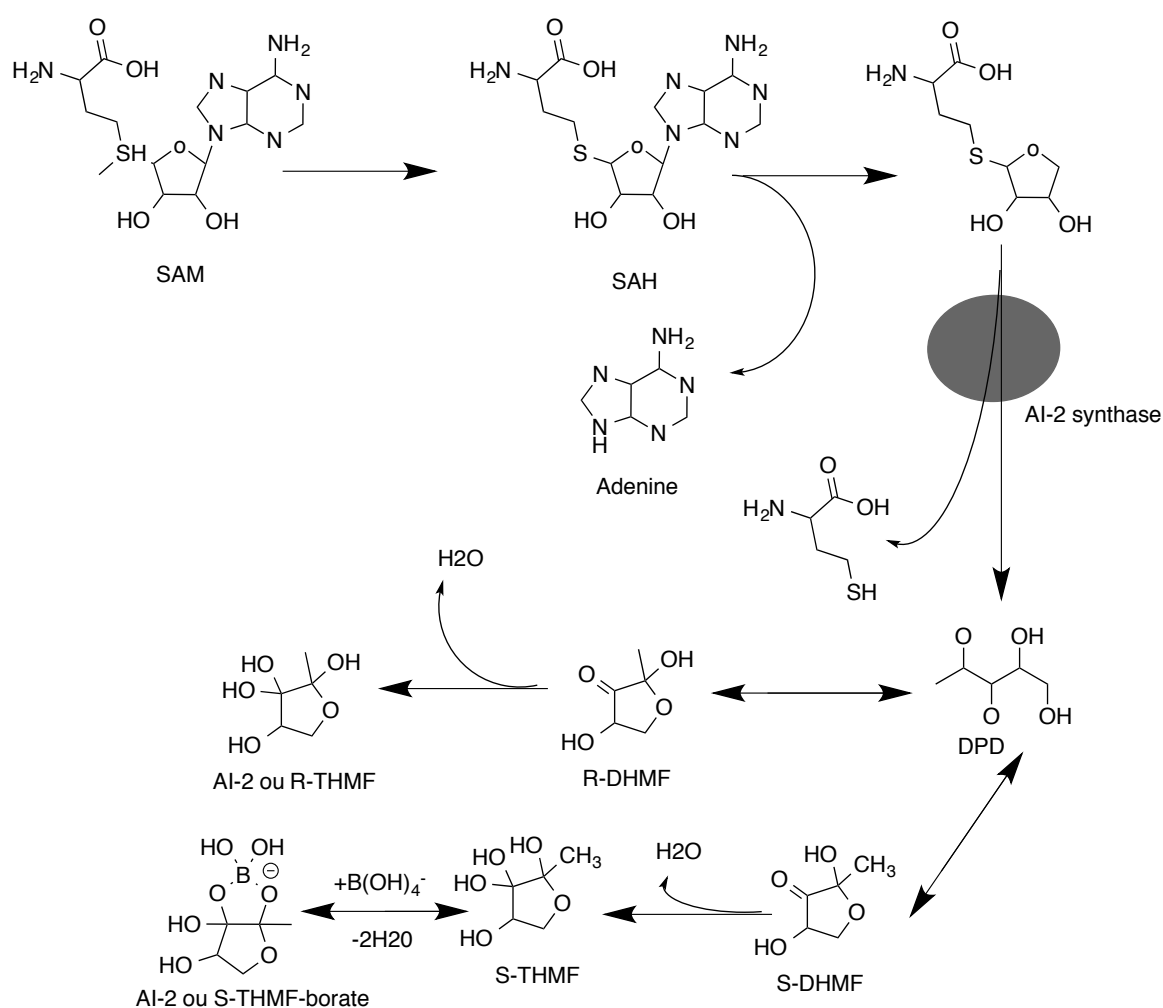


Figure 9 : Voie de biosynthèse de l'AI-2.

L'enzyme LuxS catalyse le clivage de l'homocystéine à partir de la SRH, ce qui donne le précurseur de l'AI-2. Le DPD (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione) qui réalise une réaction de cyclisation spontanée.

I-2-4-1-3 Phylogénie des gènes impliqués dans la production des AI-1 & -2

Les gènes codant les AHLs synthase (gènes orthologues de *luxI*) et le récepteur à l'AHL (gènes orthologues de *luxR*) sont retrouvés dans un grand nombre de protéobactéries taxonomiquement diversifiées (tableau annexe 12 diversité taxonomique du gène *luxI* ainsi que tableau 5 liste des gènes composant la famille *luxI*, AHLs, phénotypes et bactéries associées) (Case et al. 2008, Gelencsér et al. 2012). Au cours de l'évolution le couple de gène *luxI/luxR* est apparu tôt chez les protéobactéries (Lerat & Moran 2004). Dans la majorité des cas les bactéries ont acquis ces gènes grâce à des transferts horizontaux (**Figure 10**) (Kimura 2014), surtout chez les bactéries possédant plusieurs voies de type *luxI/luxR* (Gray & Garey

2001). En effet, sur la base de l'étude de ces gènes, les différentes classes de *Proteobacteria* apparaissent non monophylétiques, suggérant ainsi une acquisition de ces gènes par transfert horizontal comme on le constate sur les arbres phylogénétiques de la **Figure 10**. Le gène *luxS* qui code l'enzyme principale de la voie de biosynthèse de l'AI-2 est davantage fréquent dans le génome des bactéries Gram négative et Gram positive (tableau annexe 15 diversité taxonomique du gène *luxS*) (**Figure 11**) (Lerat & Moran 2004, Sun et al. 2004).

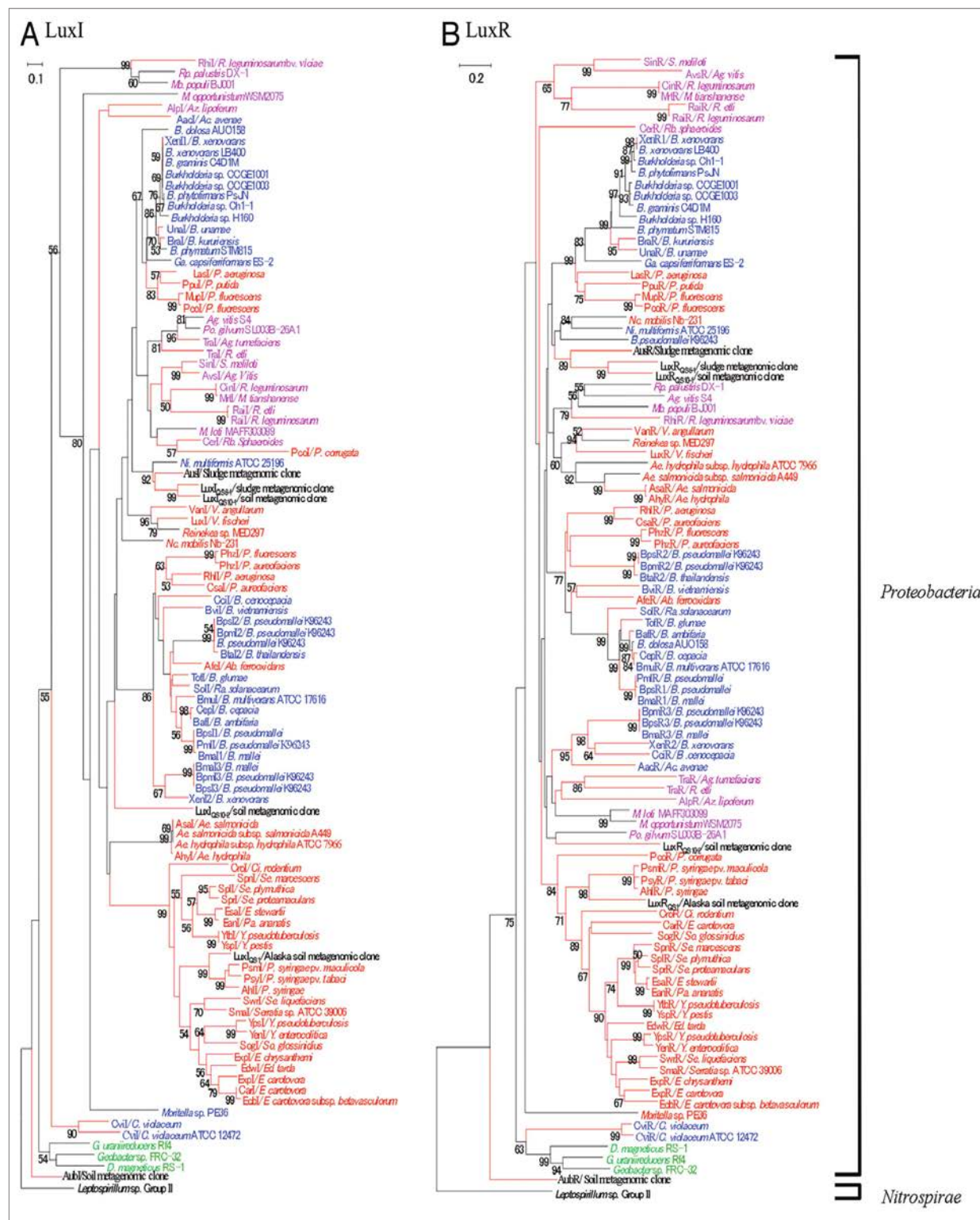


Figure 10 : Arbres phylogénétiques des gènes *luxI* à gauche et *luxR* à droite. En violet les *Alpha-Proteobacteria*, en bleu les *Beta-Proteobacteria*, en rouge les *Gamma-Proteobacteria* et en vert les *Delta-Proteobacteria* (Kimura 2014). La non-monophylie des différentes classes de *Proteobacteria* suggère une acquisition de ces gènes par transfert horizontal.

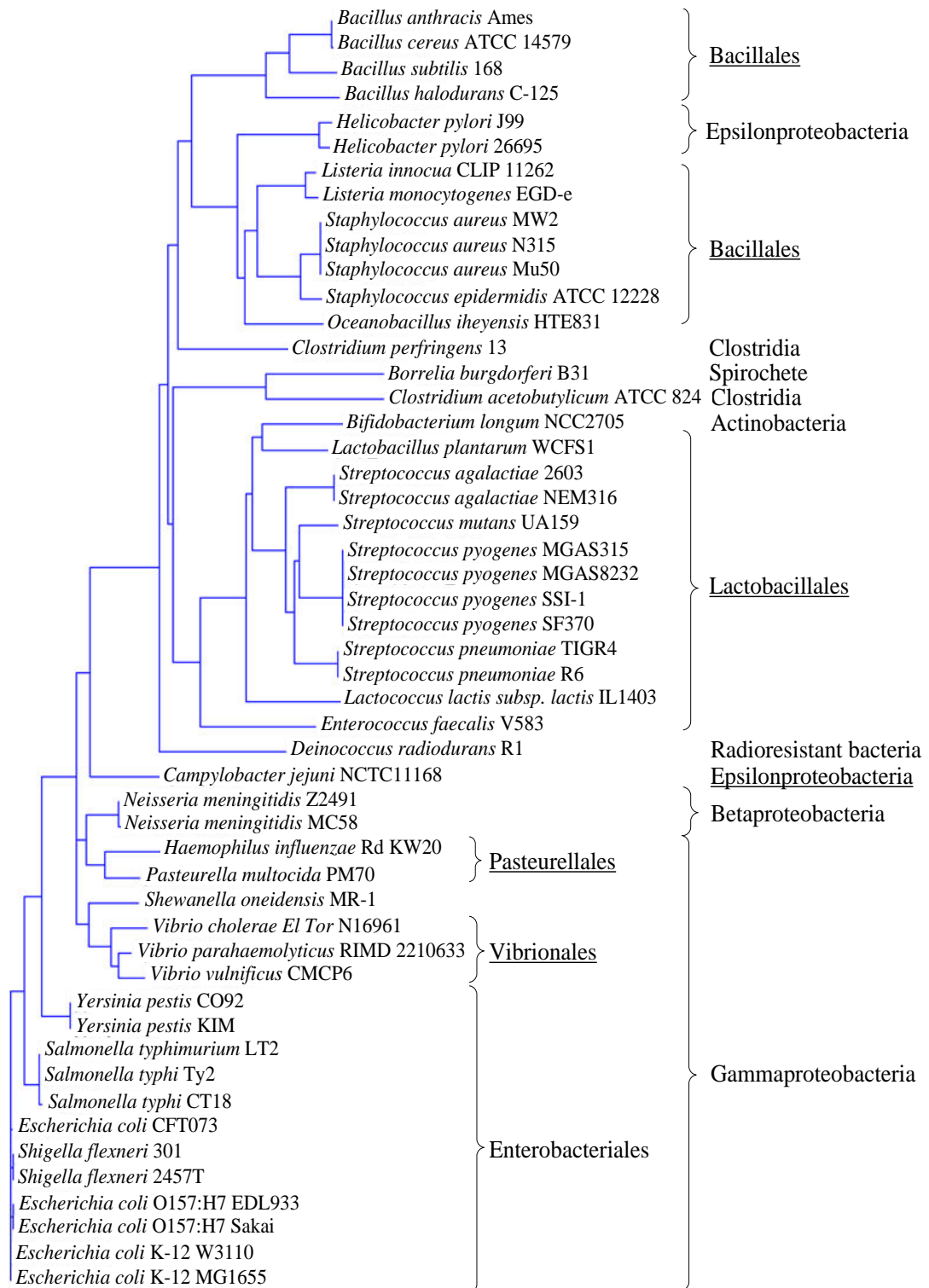


Figure 11 : Arbre phylogénétique en NJ des séquences protéiques de LuxS
Comme pour les gènes *luxI* et *luxR*, une acquisition de ces gènes par transfert horizontal est supposée (Sun et al. 2004).

I-2-4-2 Les autres molécules signal

I-2-4-2-1 L'Auto-Inducteur de type 3 (AI-3)

Il existe un troisième type d'auto-inducteur AI-3 qui est présent chez des bactéries entéropathogènes du type Entero-Hémorragique *Escherichia coli* (EHEC) (Sperandio et al. 2003). Le gène *luxS* serait également impliqué dans la voie de synthèse de l'AI-3. Cet auto-inducteur serait reconnu par les cellules intestinales des mammifères. L'AI-3 serait produit en réponse à la présence d'épinéphrine et de norépinéphrine (Walters & Sperandio 2006) dans l'environnement des bactéries. Cette molécule serait perçue par un récepteur à deux composants QseC et QseB (Clarke & Sperandio 2005). Ce système est peu étudié, ni la voie de biosynthèse ni la structure moléculaire de l'AI-3 n'ont encore été élucidées (**Tableau 1**).

I-2-4-2-2 Le Cholerae Auto-Inducteur (CAI)

Le CAI-1 (ou Cholerae auto-inducteur 1) (Henke & Bassler 2004) est une molécule signal appelée (S)-3-hydroxytridecan-4-one (**Figure 12**) (Milton 2006, Tang & Zhang 2014). L'enzyme principale de la voie de biosynthèse est CqsA (pour *cholerae* quorum sensing autoinducer) et le récepteur se nomme CqsS (pour *cholerae* quorum sensing sensor) (Kelly et al. 2009). Cette molécule signal est produite par de nombreux représentants du genre *Vibrio* et elle participerait à la régulation de la production de facteurs de virulence (Kelly et al. 2009). Cette molécule signal est donc présente dans l'environnement marin, étant donné qu'elle est produite par des vibrios isolés à partir de ces milieux naturels (Henke & Bassler 2004).

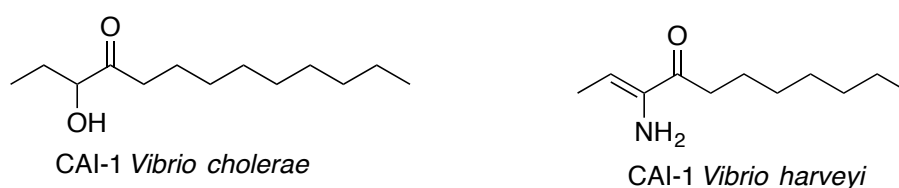


Figure 12 : Structures moléculaires des CAI.

I-2-4-2-3 Le 3-hydroxy Palmitic Acid Methyl Ester (PAME)

Le 3-hydroxy palmitic acid methyl ester (3OH-PAME) est une molécule signal volatile (**Figure 13**) produite par la bactérie du sol *Ralstonia solanacearum* (Flavier et al. 1997). L'enzyme-clé de la voie de synthèse de cette molécule signal est une S-adenosyl methionine-dependent methyl transferase codée par le gène *phcB*, l'enzyme convertit le 3-

hydroxypalmitic acid en ajoutant le methyl ester (von Bodman et al. 2003) ce qui donne le 3-OH-PAME (Uroz et al. 2009). La réception de ce signal est ici aussi basée sur un système à deux composants PhcS-PhcR (Waters & Bassler 2005) qui activent l'expression de PhcA, qui elle même active l'expression de SolI une AHL synthase ce qui entraine l'expression de facteurs de virulence (Flavier et al. 1997).

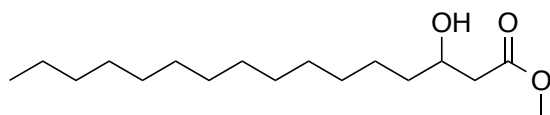


Figure 13 : Structure moléculaire du 3-OH-PAME

I-2-4-2-4 Le Pseudomonas Quinolone Signal (PQS)

Le PQS ou Pseudomonas Quinolone Signal ou encore 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (**Figure 14**) est un signal moléculaire présent chez la bactérie *Pseudomonas* (Venturi 2006). Il est synthétisé à partir du précurseur 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) (Reen et al. 2011). Ce signal moléculaire fait partie de la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) et est synthétisé par une enzyme codée par l'opéron *pqsABCD* et le gène *pqsH*. Il permet l'activation de l'AHL synthase présente dans le génome de cette bactérie RhII, ce qui active via les AHLs l'expression du facteur de virulence *lasB* (McKnight et al. 2000). A ce jour, le PQS n'a jamais été recherché et donc trouvé chez des bactéries du genre *Pseudomonas* ayant pour habitat le milieu marin.

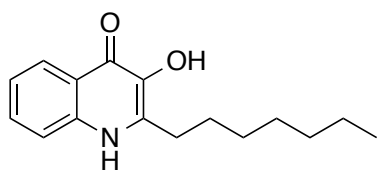


Figure 14 : Structure moléculaire du PQS

I-2-4-2-5 Les DiKetoPiperazines (DKP)

Les DKPs ou diketopiperazines seraient des signaux moléculaires dont on connaît à ce jour plusieurs représentants (**Figure 15**) (Holden et al. 1999). Certains de ces DKPs sont capables d'activer les récepteurs des AHLs (LuxR). Plusieurs protéobactéries sont capables d'émettre ce signal *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Shewanella baltica*, *Vibrio* spp, *Burkholderia cepacia* et *Enterobacter agglomerans*. Ces DKPs ont un effet antifongique, mais pas seulement, car ce signal moléculaire permet

également l'activation des gènes codant une protéine membranaire et la toxine du cholerae ctxAB (Jimenez et al. 2012). Cependant certaines études contredisent l'attribution de la fonction signal moléculaire à ces DKPs (Campbell et al. 2009). Les DKPs sont émis par les genres bactériens marins *Shewanella* et *Vibrio* spp ainsi que *Streptomyces* (Li et al. 2006, Gu et al. 2013).

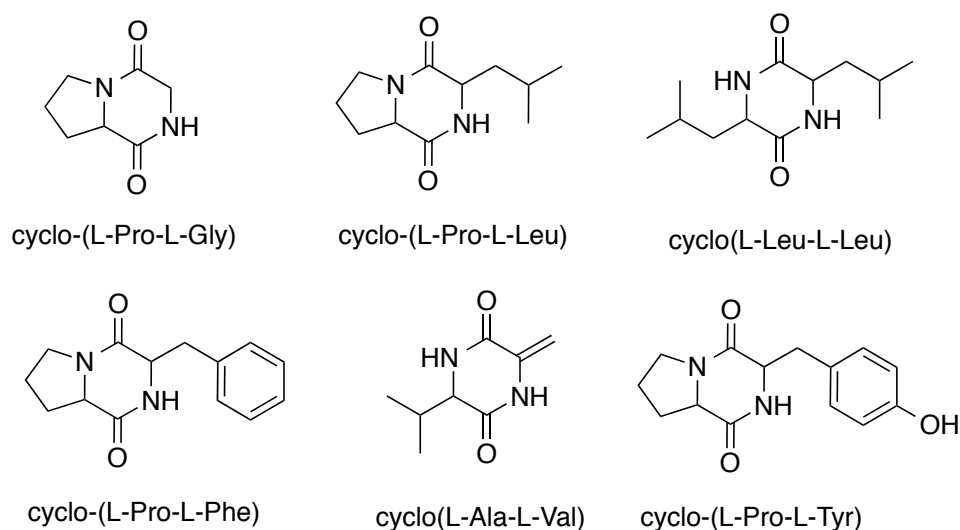


Figure 15 : Structures moléculaires des DKPs.

I-2-4-2-6 Les Diffusible Signal Factor (DSF)

Le DSF ou diffusible signal factor a été mis en évidence chez *Xanthomonas campestris* une bactérie du sol qui ne produit pas d'AHLs (Atkinson & Williams 2009) puis chez d'autres bactéries comme *Burkholderia cenocepacia* où on lui donne le nom de BDSF (Figure 16), *Xylella* et *Stentrophomonas* (Atkinson & Williams 2009). Sa structure moléculaire a été caractérisée comme étant un acide cis-11-méthyl-2-dodecenoïque (Wang et al. 2004). Les gènes de l'opéron *rpf* sont impliqués dans la synthèse et la réception de ce signal moléculaire. Le DSF régule la production de facteurs de virulence (Tang & Zhang 2014, Deng et al. 2014). A ce jour il n'a pas été mis en évidence dans l'environnement marin.

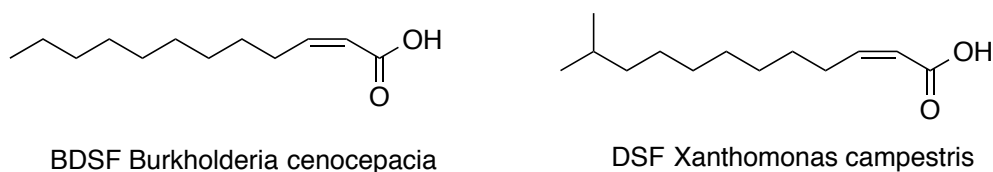


Figure 16 : Structures moléculaires des DSFs

I-2-4-2-7 Le butyrolactone (GBL)

Les GBL ou gamma butyrolactones (**Figure 17**) sont des signaux moléculaires produits par les bactéries gram + telles que *Streptomyces* et permettent la régulation de la production d'antibiotiques (Slattery et al. 2001). Les gènes *scgA* et *scgX* sont impliqués dans la production de GBL, et le gène *scgR* code son récepteur (Du et al. 2011). Les bactéries à gram + sont présentes dans l'environnement marin (Gontang et al. 2007), qu'elles fassent partie de la communauté bactérienne naturelle comme *Streptococcus* (Curràs et al. 2002) *Staphylococcus* (Gunn & Colwell 1983) *Bacillus* (Ivanova et al. 2010), ou bien qu'elles soient des contaminants dus aux activités anthropiques comme *Enterococcus* (Byappanahalli et al. 2012). Les molécules de communication qu'elles produisent sont donc potentiellement présentes dans l'environnement marin, mais cela reste hypothétique compte tenu que ces bactéries n'y sont pas naturellement présentes.

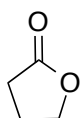


Figure 17 : Structure moléculaire du gamma-butyrolactone

I-2-4-2-8 Les facteurs A/B/C/D/E

La *Delta-Proteobacteria Myxococcus xanthus* utilise comme molécules signal cinq peptides nommés facteurs A/B/C/D/E. Parmi ces dernières seuls les facteurs A et C ont été identifiés. Le facteur C est un dimère peptidique de 34 kDa (Kim & Kaiser 1990) alors que le facteur A est un peptide de 385 acides aminés (Plamann et al. 1995). Les gènes impliqués dans la synthèse de ces protéines sont *asg* pour le facteur A, *bsg* pour le facteur B, *csg* pour le facteur C, *dsg* pour le facteur D et enfin *esg* pour le facteur E (Konovalova et al. 2012). Aucune étude sur la présence de ce type de molécule de communication n'a été menée au niveau du milieu marin.

I-2-4-2-9 Les Auto-Inducing Peptides (AIP)

Les bactéries à gram + utilisent comme signaux moléculaires des AIPs ou autoinducing peptides (**Figure 18**) (Ji et al. 1995). Lorsque la concentration extracellulaire d'AIPs est élevée, ils se lient à leur récepteur membranaire (Kleerebezem et al. 1997), puis activent les gènes cibles par une cascade de phosphorylation (Rutherford & Bassler 2012). L'AIP est un peptide comprenant un thiolactone et de 7 à 9 acides aminés parmi lesquels une

cystéine qui est l'acide aminé central et qui permet la liaison covalente avec la partie C-terminale de l'acide aminé carboxylate ce qui donne un cycle thioester (Atkinson & Williams 2009). On connaît plusieurs types d'AIP comme le CSP (Competence Stimulating Peptide) chez *Streptococcus* qui lui permet de réguler sa capacité à absorber de l'ADN, le GBAP (Gelatinase Biosynthesis Activating Pheromone) chez *Enterococcus faecalis* qui favorise la régulation de facteurs virulence, les AIPs I à IV chez *Staphylococcus aureus* qui lui permettent de contrôler la production de facteur de virulence et le ComX (**Competence X**) chez *Bacillus subtilis* qui permet de gérer la sporulation et la compétence bactérienne (Ramsey et al. 2009). Tous ces AIPs sont formés à partir d'une pré-protéine.

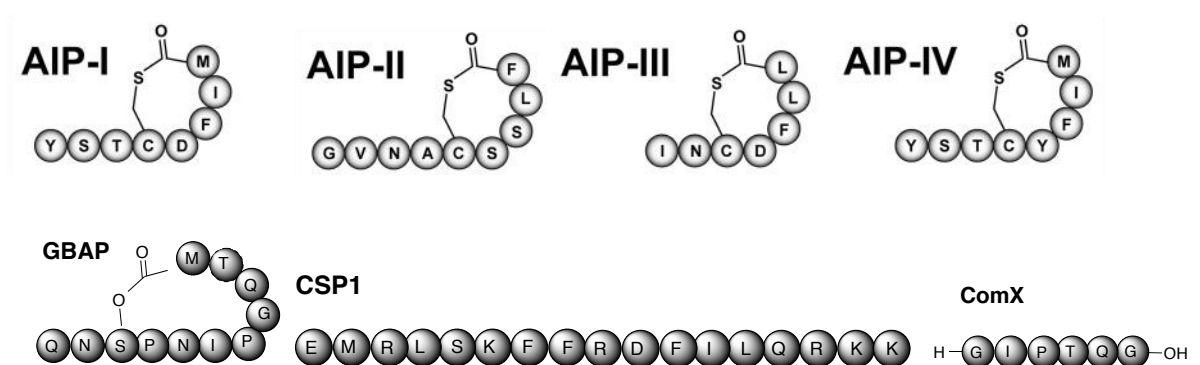


Figure 18 : Structure moléculaire des AIPs

Structure moléculaire des AIP de *Staphylococcus aureus* (I à IV) (Malone et al. 2007), d'*Enterococcus faecalis* (GBAP), ou des séquences peptidiques des AIPs de *Streptococcus* (CSP1) et de *Bacillus subtilis* (ComX).

I-2-4-2-10 La bradyoxetine (CDF)

La Bradyoxetine ou CDF est une molécule produite par la bactérie *Bradyrhizobium japonicum*, et détectée chez plusieurs autres bactéries membres des *Alpha-Proteobacteria* (Loh, Carlson, et al. 2002). Une structure moléculaire a été proposée (**Figure 19**) (González & Keshavan 2006). Le gène impliqué dans sa voie de biosynthèse n'a pas encore été identifié, mais cette molécule serait réceptionnée par un récepteur à deux composants, NwsB. Sa synthèse serait activée par une quantité faible de Fe^{3+} et une forte densité cellulaire. Cette molécule signal permettrait la régulation négative de la nodulation chez les légumineuses (Jitacksorn & Sadowsky 2008).

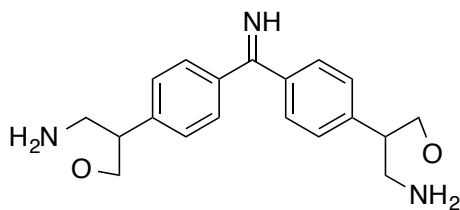


Figure 19 : Structure moléculaire de la Bradyoxetine.

I-2-4-2-11 L'indole : l'acide indole-3-acétique (IAA)

Les molécules de la famille des indoles comme l'acide indole-3-acétique (**Figure 20**) sont également des molécules de communication permettant aux bactéries marines d'interagir entre elles (Lee & Lee 2010) et avec des diatomées marines (Amin et al. 2012). Cette molécule est aussi une hormone de plante appelée auxine (Davies 2010), et qui sert donc de messenger chimique entre les cellules du végétal. L'acide indole-3-acétique est synthétisé à partir du tryptophane.

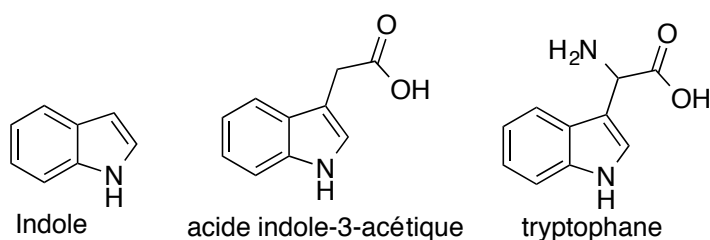


Figure 20 : Structures moléculaires de l'indole (à gauche), de l'acide indole-3-acétique (au milieu) et tryptophane (à droite).

I-2-4-2-12 L'acide tropodithietique (TDA)

L'acide tropodithietique ou TDA (**Figure 21**) est une molécule ayant des propriétés antibiotiques, qui est produite par plusieurs bactéries marines de la famille des *Rhodobacteraceae*. La voie de biosynthèse de cette molécule est codée par les gènes de la famille *tda* operon *tdaABCDEF* ainsi que les gènes *cysI*, *maly*, *paalJK*, et *tdaH* (Geng et al. 2008, Geng & Belas 2010). Le TDA est un auto-incuteur comme les AI-1 car sa voie métabolique a une boucle de rétro-action positive, et que le phénotype sauvage des mutants dont la voie TDA est non-fonctionnelle est restauré par l'ajout de TDA. Les *Rhodobacteraceae* produisent le TDA surtout lorsqu'elles forment un biofilm (Geng & Belas 2010). La production de TDA serait régulée par le QS basé sur les AHLs (Berger et al. 2011).

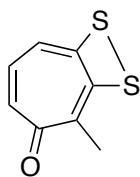
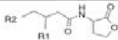
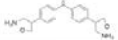






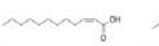
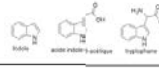





Figure 21 : Structures moléculaires de l'acide tropodithietique

D'une manière générale les bactéries qu'elles soient à gram négatif ou positif, produisent des molécules de communication lorsqu'elles sont en densité suffisante (**Figure 22**) et la synthèse de ces molécules permet de réguler des phénotypes bactériens variés. Cependant, un genre bactérien donné ne produit pas exclusivement une seule molécule de communication, et les différentes voies de QS d'une même bactérie sont souvent interconnectées.

Tableau 1 : Structures moléculaires et bactéries produisant les différentes molécules signal.

	Molécule	Bacteria	Structure moléculaire	Exemples d'activités régulées
GRAM -	AI-1	<i>Proteobacteria</i>		Biofilm / Bioluminescence
	Bradyoxetine	<i>Bradyrhizobium</i>		Nodulation
	AI-3	EHEC	Non connue	Non connu
	TDA	<i>Rhodobacteraceae</i>		Non connu
	Facteurs A/B/C/D/E	Δ - <i>Proteobacteria</i>		Fructification
	CAI	<i>Vibrio</i>		Facteurs de virulence
	PAME	<i>Ralstonia</i>		Facteurs de virulence
	PQS	<i>Pseudomonas</i>		Facteurs de virulence
	DKP	<i>Proteobacteria</i>		Protéine membranaire / Toxine
	DSF	<i>Proteobacteria</i>		Facteurs de virulence
GRAM - & +	IAA	<i>Bacteria</i>		Formation biofilm / Facteurs de virulence
	AI-2	<i>Bacteria</i>		Bioluminescence / Communication bactérienne inter-spécifique
GRAM +	Butyrolactone	<i>Streptomyces</i>		Synthèse d'antibiotiques
	AIP	<i>Firmicutes</i>		Facteurs de virulence / Competence / Sporulation

I-2-4-4 Les AI-1 : centre des interconnexions de plusieurs voies de QS bactérien

D'une manière générale, on constate clairement que les AI-1 ou AHL sont présents dans tous les cas d'interconnexion des différentes voies de QS. De plus, les AHLs sont produites par un grand nombre de proteobactéries. Ces molécules signal feront donc principalement l'objet de mon étude.

La bactérie marine *Vibrio harveyi* comporte 3 voies de QS: celle des AI-1 dont le gène codant l'AI-1 synthase est *luxM*, celle des AI-2 dont le gène codant l'AI-2 synthase est *luxS* et enfin celle du CAI dont le gène codant la CAI synthase est *cqsA* (Henke & Bassler 2004). Ces trois voies sont interconnectées et régulent l'émission de bioluminescence et d'autres activités. Chacun de ces trois signaux moléculaires est reçu par un récepteur, respectivement LuxN, CqsS et LuxQ, qui transmet l'information en phosphorylant ou déphosphorylant la protéine LuxU qui elle-même transmet le signal à la protéine LuxO. Lorsque la densité cellulaire est faible, la protéine LuxU est phosphorylée et phosphoryle LuxO (Henke & Bassler 2004). Quand la densité bactérienne atteint le quorum les molécules signal (AI-1, AI-2 ou CAI)

modifient la fonction de leurs récepteurs qui déphosphorylent LuxU entraînant la déphosphorylation de LuxO, ce qui active ou réprime certains gènes contrôlés par ce mécanisme (Henke & Bassler 2004).

La bactérie du sol *Ralstonia solanacearum* produit les deux types de molécule signal : AI-1 et 3-OH-PAME. La réception du 3OH-PAME est basée sur un système à deux composants PhcS-PhcR (Waters & Bassler 2005), qui active l'expression de la protéine PhcA. Cette protéine active l'expression de SolI une AHL synthase (Clough et al. 1997) ce qui entraîne l'expression de facteurs de virulence (Flavier et al. 1997).

La bactérie anthropopathogène *Pseudomonas aeruginosa* synthétise le PQS. Le gène *lasI* code l'enzyme LasI qui synthétise l'AHL 3-oxo-C12-HSL, qui active le récepteur de l'AHL LasR et du PQS PqsR (McKnight et al. 2000). L'association PQS-PqsR active le gène *rhII* qui code l'enzyme RhII permettant la production de l'AHL C4-HSL. Cela a pour effet d'activer l'expression du gène *lasB* qui code pour un facteur de virulence (Jimenez et al. 2012).

Les DKPs sont des dimères d'acides aminés, certains ont été décrits comme déclenchant les récepteur des AI-1 : LuxR, ce qui peut activer la fonction bactérienne régulée par ce récepteur (González & Keshavan 2006). Cependant leur statut de signal moléculaire est controversé (Campbell et al. 2009).

La bactérie *Phaeobacter gallaeciensis* fait partie de la famille des *Rhodobacteraceae*. Elle est connue pour synthétiser du TDA, et la production de cette molécule signal est régulée par la voie de QS basée sur les AI-1 (Berger et al. 2011).

La protéobactérie *Rhizobium leguminosarum* est un exemple de bactérie qui synthétise différents AI-1. Elle possède plusieurs voies de QS basé sur les AI-1, qui sont interconnectées entre elles : *cinIR* / *raiIR* / *rhiIR* / *traIR*, ainsi que le gène *bisR* de la famille des *luxR*, mais qui n'a pas de gène de la famille des *luxI* associé. La voie *cinIR* régule l'expression de la voie *traIR* via l'AHL 3-OH-C14:1-HSL. Les autres liens entre les différents voie d'AI-1 de cette souche ne sont pas encore clairement établis (Edwards et al. 2009).

I-2-4-5 Les autres activités biologiques des molécules signal

Certains AI-1 ou AHLs sont connus pour avoir une activité antibiotique et également chélatrice du fer (Kaufmann et al. 2005) (Schertzer et al. 2009). En effet l'AHL N-(3-oxodo-

decanoyl)-L-homoserine lactone ou 3-oxo-C12-HSL et le produit de sa dégradation 3-(1-hydroxydecylidene)-5-(2-hydroxyethyl)pyrrolidine-2,4-dione ont des propriétés antibiotiques contre les bactéries de type gram positif (Kaufmann et al. 2005). De plus le 3-(1-hydroxydecylidene)-5-(2-hydroxyethyl)pyrrolidine-2,4-dione aurait une propriété additionnelle, celle de lier le fer un peu comme un sidérophore (Kaufmann et al. 2005). La bactérie marine *Mesorhizobium sp* produit une AHL 5-cis-3-oxo-C12-HSL qui a aussi des propriétés antiactérienne et cytotoxique (Krick et al. 2007).

Le PQS est également impliqué dans d'autres activités biologiques, telles que la capacité à se lier au fer (Fe^{3+}) afin de faciliter l'absorption de ce dernier (Diggle et al. 2007, Bredenbruch et al. 2006), et à s'insérer entre les lipides membranaires ce qui favoriserait la formation des vésicules chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* qui est (Mashburn-Warren et al. 2008) intensément étudiée (Schertzer et al. 2009).

Les DKPs ont également plusieurs d'activités biologiques, telles que des fonctions antitumorales, antivirales, antifongiques, antibactériennes...(Martins & Carvalho 2007)

On connaît deux AIPs ayant une fonction autre que celle de communication, la nisine produite par *Lactococcus lactis* et la subtiline synthétisée par *Bacillus subtilis*. Ces AIPs ont une activité antibiotique à l'instar de certains autres micro-organismes *bacteria*, *fungi* et *virus* (Schertzer et al. 2009) (Kleerebezem 2004).

Le TDA possède aussi des propriétés antibiotiques contre plusieurs bactéries gram négatif comme *Salmonella* et positif telle que *Staphylococcus* (Porsby et al. 2011).

I-2-5 L'inhibition du quorum sensing bactérien

I-2-5-1 Les facteurs abiotiques

Certains facteurs abiotiques comme la température et le pH affectent la structure des AI-1 (Decho et al. 2010). Une température élevée ou un pH basique entraînent l'hydrolyse du cycle lactone des AHLs ce qui donne une N-acyl-homoserine (Yates et al. 2002). Par exemple, le pH de l'eau de mer est autour de 8 ce qui favorise l'hydrolyse des AHLs à chaîne courte (4 à 8 carbones), celles ayant une chaîne plus longue (10 à 18 carbones) sont donc plus stables à un pH élevé (Wagner-Döbler et al. 2005). Un pH acide permet de maintenir le cycle lactone fermé (**Figure 22**) (Horswill et al. 2006). La vitesse de dégradation des AHLs dans l'eau de mer dépend de la longueur de sa chaîne ainsi que de la présence de substitution sur

son carbone 3 (Hmelo & Mooy 2009). La molécule signal peut donc être modifiée par l'environnement. Cela engendre trois possibilités : soit elle devient inactive comme signal soit elle reste active, ou bien elle peut même devenir un antagoniste du QS (Decho et al. 2010).

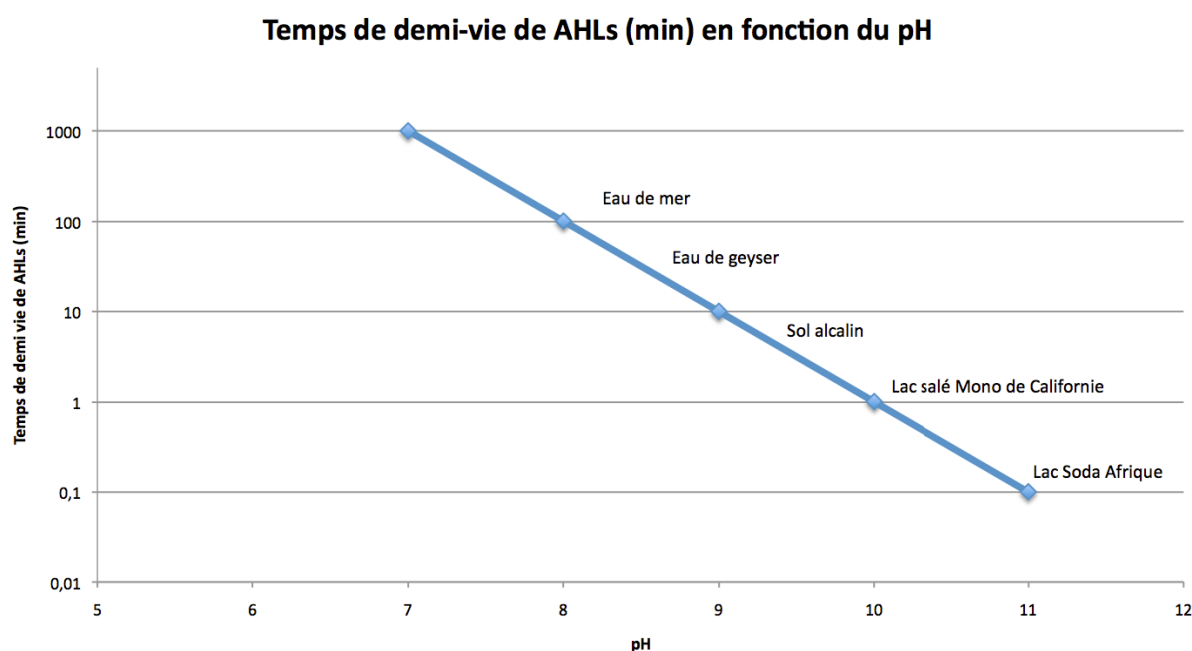


Figure 22 : Temps de demi-vie des AHLs ou AI-1 dans les différents environnements alcalins (Horswill et al. 2006)

I-2-5-2 Les inhibiteurs moléculaires (mimétisme et réaction chimique)

L'inhibition du QS peut être également effective grâce à des molécules mimant les signaux moléculaires du QS. Ces molécules sont produites par différents types d'organismes tels que des plantes, des champignons, des algues, des bactéries...

De nombreuses plantes comme l'ail, la glycine, le riz... produisent différentes molécules mimant les AHLs (Uroz et al. 2009), ce qui a pour effet de stimuler ou réprimer certaines fonctions régulées par le QS basé sur les AI-1. La majorité de ces composés n'a pas été caractérisé, mais leur existence suggère l'établissement d'interactions entre les bactéries et les plantes.

La pénicilline et la patuline sont des composés produits par des champignons et ont des activités inhibitrices du QS (Rasmussen 2006).

Un autre mécanisme d'inhibition du QS consiste à limiter le nombre de récepteurs aux AI-1. Les furanones halogénées produites par l'algue *Delisea pulchra* (**Figure 23**) interfèrent avec le QS en se liant aux récepteurs des AI-1 et en induisant leur dégradation (Rasmussen et al. 2000, Manefield et al. 2002). L'inhibition du QS dans ce cas précis permet de limiter la colonisation des thalles de l'algue par les bactéries et ainsi la formation d'un biofilm. Certains composés phénoliques sont également connus pour altérer les récepteurs des signaux moléculaires du QS. Les DKPs ont également le même type d'action (Li et al. 2006).

Chlamydomonas reinhardtii est une algue unicellulaire vivant dans les sols et l'eau douce, elle est connue pour produire toute une gamme de molécules activant ou inhibant les fonctions bactériennes contrôlées par le QS basé sur les AI-1 (Teplitski et al. 2004, Rajamani et al. 2011).

Les AHLs elles-mêmes peuvent avoir un effet inhibiteur du QS. Par exemple les AHLs oxo-C10-HSL à une concentration de 4,6 nmol et oxo-C14-HSL à une concentration de 3,8 nmol inhibent le QS de la bactérie *Chromobacterium violaceum* chez qui il est réalisé grâce à la C6-HSL (McClellan et al. 1997, Uroz et al. 2009). Il existe également des molécules (comme le triclosan) (**Figure 23**) qui inhibent la voie de biosynthèse des AHLs (Zhang & Dong 2004).

De même pour les AIPs, l'AIP-I peut activer un gène chez une souche de bactérie et ce même AIP-I peut inhiber (**Figure 23**) cette fonction chez une autre souche produisant l'AIP-IV (Zhang & Dong 2004). De plus certains AIPs tronqués ont un effet inhibiteur du QS chez *Staphylococcus spp* (Brackman & Coenye 2015).

D'autres molécules, mais synthétiques telles que la N-(3-nitro-phenylacetanoyl)-L-homoserine lactone ont également la caractéristique d'inhiber le QS. Mais dans certains cas cette famille de molécules peut aussi l'activer (Geske, O'Neill, & Blackwell 2007, Geske, O'Neill, Miller, et al. 2007). Bien sûr la synthèse chimique de ces molécules s'inspire des structures de celles qui existent naturellement (McDougald et al. 2007).

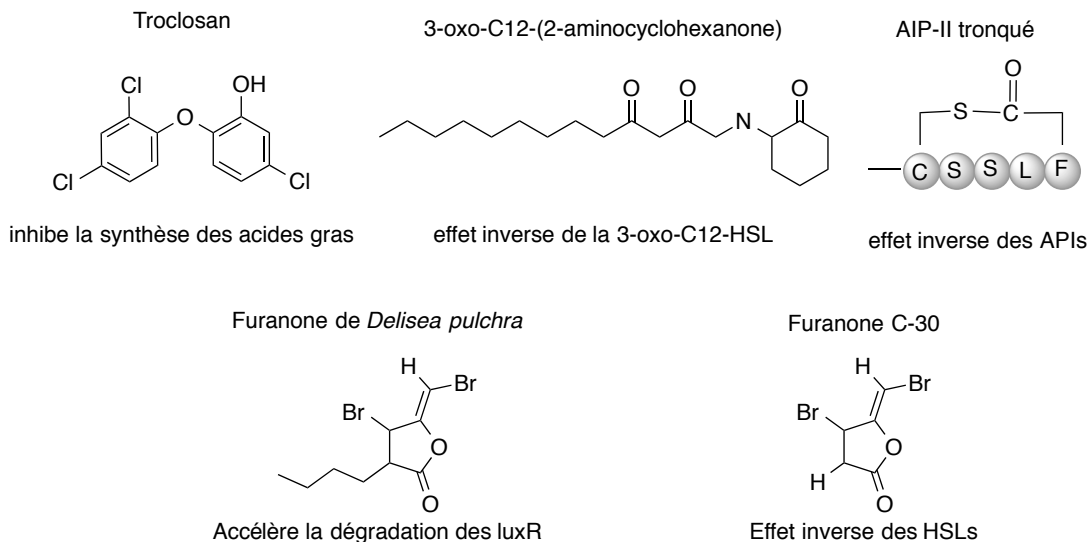


Figure 23: Exemples de molécules inhibitrices du quorum sensing (Zhang & Dong 2004)

I-2-5-3 Les enzymes (acylases et lactonases)

Pour contrebalancer le QS, certains organismes possèdent des enzymes permettant de dégrader les signaux de QS. Ce mécanisme est appelé le Quorum Quenching ou QQ. A ce jour 3 familles d'enzymes capables de dégrader les AHLs ont été mises en évidence : les AHL-lactonases, les AHL-acylases et AHL-oxido-reductases.

Les lactonases comptent deux sous-groupes : les AiiA et les AttM chez les bactéries (Dong & Zhang 2005). Elles ont été identifiées chez plusieurs espèces de bactéries à gram + et -. Elles hydrolysent de manière spécifique le cycle lactone (**Figure 24**) pour donner les acyl-homosérines correspondantes, ces dernières montrent une activité biologique réduite. C'est le même effet qu'une alcalinisation du pH et c'est donc réversible par une acidification du pH (Zhang & Dong 2004). On trouve des lactonases également chez les cellules de mammifères (paraaxonases) (Uroz et al. 2009).

Les acylases sont homologues à AiiD, elles brisent la liaison amide des AHL, ce qui donne une chaîne aliphatique et une homoserine (**Figure 24**). C'est donc une réaction irréversible, ce qui limite là encore l'activité biologique.

Enfin les AHL oxidasés et reductases sont des enzymes produites uniquement par les bactéries, elles modifient les AHLs sans les dégrader (Kalia 2013).

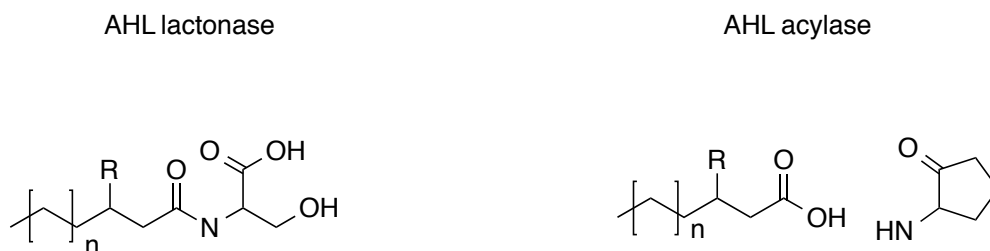


Figure 24 : Dégradation des AHLs par les enzymes acylases et lactonases (Zhang & Dong 2004).

La dégradation des AHLs par les bactéries elles-mêmes leur donne de nombreux avantages comme l'inhibition des activités contrôlées par le QS, la résistance à l'activité antibiotique de certaines AHLs, la source de nutriments. Certaines bactéries ont la capacité de produire et de dégrader les AHLs, ce qui leur confère la capacité de réguler finement la quantité d'AHL, et de ce fait la fonction biologique contrôlée.

I-2-5-4 Les applications de l'inhibition du quorum sensing

L'inhibition de la communication bactérienne par les différents moyens cités auparavant a de nombreuses applications industrielles et thérapeutiques potentielles face à des bactéries envahissantes ou pathogènes, dans les domaines de la médecine (Kalia 2013), de l'élevage (aquaculture, pisciculture, conchyliculture, boviniculture, aviculture...) (Defoirdt et al. 2004), de l'agriculture ainsi que dans l'environnement. Au niveau médical c'est la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* qui a été la plus étudiée car elle est responsable de nombreuses pathologies nosocomiales, est souvent résistante aux antibiotiques, et est capable de former des biofilms. L'expression de ses facteurs de virulence étant régulée par le QS, des essais thérapeutiques d'utilisation du quorum quenching sont en cours (Habeck 2003). Au niveau industriel des études sont en cours sur des inhibiteurs du QS qui permettraient aussi l'inhibition du phénomène de "biofouling" ou colonisation des surfaces qui pose problème au niveau des coques de bateaux par exemple (Li, Dobretsov, et al. 2006, Dobretsov et al. 2011).

De nombreuses études ont actuellement pour but d'identifier des molécules et des enzymes inhibitrices du QS. Ces molécules et enzymes sont extraites des différents écosystèmes marins (Skindersoe et al. 2007) et terrestres, mais également de différents organismes comme les bactéries elles-mêmes (Roche 2004, Morohoshi et al. 2008), des eucaryotes animaux (Xu et al. 2003, Chun et al. 2004), ou des plantes (Dong et al. 2001) et peuvent même être synthétiques (Chung et al. 2011). Récemment, certains chercheurs ont

également utilisé des techniques de métagénomique pour trouver des molécules et des enzymes inhibitrices du quorum sensing (Romero et al. 2011, 2012). L'étude des mécanismes de QS chez les bactéries marines pourrait donc avoir des applications dans les domaines de l'aquaculture, la pisciculture et la conchyliculture.

I-2-6 Le quorum sensing intra- et inter- domaines

Les bactéries ne sont pas les seuls micro-organismes à communiquer grâce à des mécanismes de QS. En effet les champignons unicellulaires, certains genres de phytoplancton et les archées ont également mis en place des mécanismes de ce type.

I-2-6-1 La communication intra-domaine

I-2-6-1-1 Le quorum sensing entre les Archées

Quelques études ont été menées sur la présence de QS chez les archées dont la première sur *Natronococcus occultus*, isolée d'un lac salé, où il a été supputé la production d'AHL (Paggi et al. 2003). Chez une autre archée *Methanosaeta harundinacea*, isolée de boues de stations d'épuration, une AHL carboxylée a été détectée et identifiée (**Figure 25**), ainsi que les gènes codant l'AHL synthase et le récepteur d'AHL *filI-filR* (Zhang et al. 2012). Les techniques utilisées pour détecter et caractériser la présence des AHLs sont les mêmes que pour les AHLs produites par des bactéries. Enfin, la production d'AI-2 par les archées a été suggérée (Sun et al. 2004). Cependant, la présence de mécanisme de QS chez les archées issues de l'environnement marin n'a pas encore été étudiée.

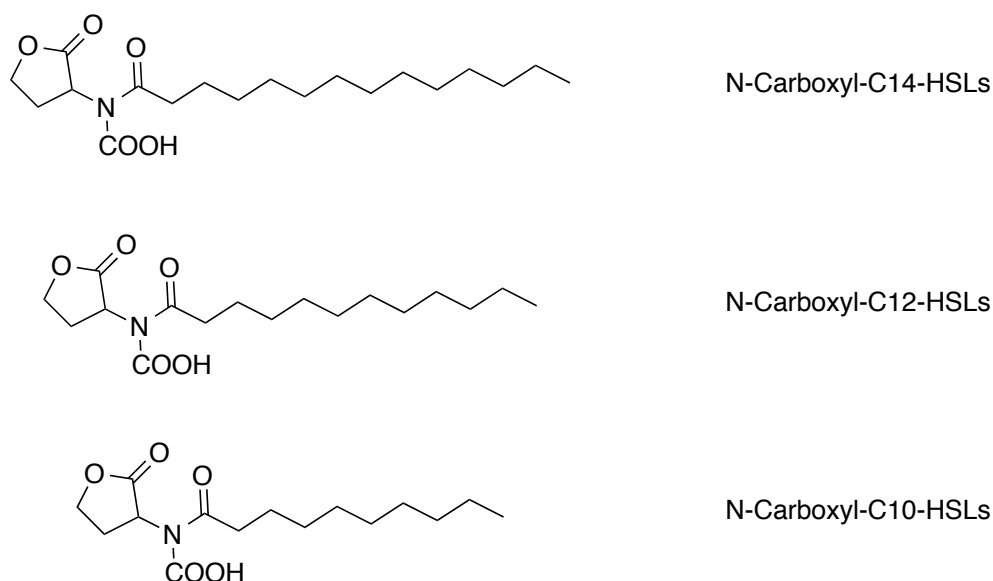


Figure 25 : Possibles structures moléculaires de l'AHL carboxylée produite par les Archées (Zhang et al. 2012)

I-2-6-1-2 Le quorum sensing entre les Eucaryotes

Les levures comme *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Hogan 2006) sont capables de produire des molécules signal appelées farnesol (ou 3,7,11-tri-méthyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol) (**Figure 26**). Ce sont les premières molécules de signal intercellulaire mise en évidence chez des micro-organismes eucaryotes (Hornby et al. 2001). D'autres composés comme le tyrosol d'alcool aromatique chez *C. albicans*, ainsi que le phényléthanol et le tryptophol (**Figure 26**) pour *S. cerevisiae* (Wuster & Babu 2009) ont également été décrits comme des molécules de communication chez ces organismes. La levure *Candida albicans* est dimorphique, elle peut être sous forme de levure ou bien sous forme de mycelium. Le passage d'une forme à l'autre dépend du nombre de cellule (densité de la population) présent dans l'inoculum de départ (Nickerson et al. 2006). S'il est faible la forme mycelium sera favorisée, au contraire s'il est élevé la forme levure restera comme telle (Atkinson & Williams 2009, Albuquerque et Casadevall 2012).

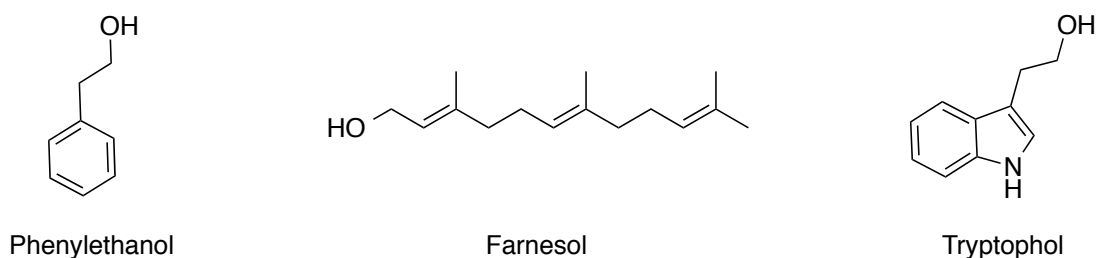


Figure 26 : Structures moléculaires du phényléthanol (à gauche), du farnesol (au centre) et du tryptophol (à droite)

Les diatomées comme *Gomphonema parvulum* produisent des phéromones telles que l'hormosirene, la dictyoptérine A, et le finavarrene. *Asterionella formosa* synthétise du fucoserrattene et *Skeletonema* émet des ectocarpenes, (**Figure 27**) qui leur servent probablement à coordonner l'expression de gène dans les gamètes (Amin et al. 2012). D'autres diatomées produisent de l'oxide nitrique qui lorsqu'il atteint une concentration élevée agit comme un signal moléculaire et permet l'immunisation des diatomées de la colonie en temps de stress (Amin et al. 2012).

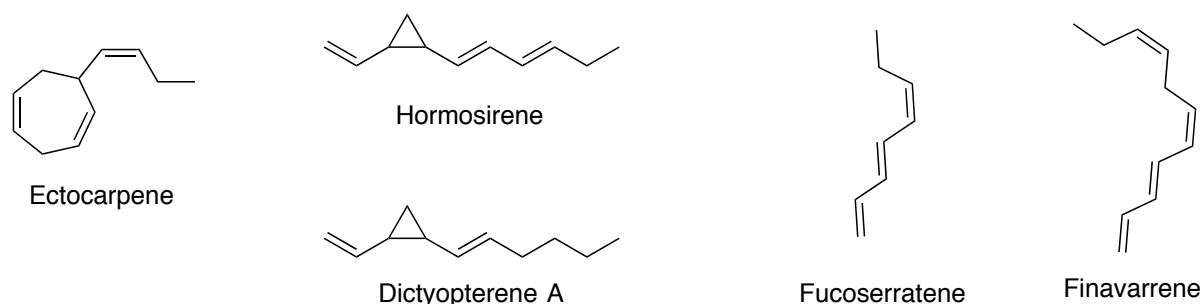


Figure 27 : Phéromones produites par les Diatomées : ectocarpene, hormosirene, dictyoptere A, fucoserrattene et finavarrene (Amin et al. 2012)

I-2-6-3 La communication inter-domaines

I-2-6-3-1 La communication entre les plantes et les bactéries

De nombreuses plantes vivent en association avec des bactéries, qu'elles soient bénéfiques ou bien pathogènes pour elles. Une grande partie de ces bactéries est capable d'émettre des molécules signal impliquées dans le mécanisme de QS (Gonzalez & Marketon 2003). La communication entre les légumineuses et les bactéries du genre *Rhizobia* est basée sur les molécules signal appelées facteurs NOD synthétisés par la bactérie et les flavonoïdes produits par la plante (Cooper 2007). Même si les plantes sont capables de détecter ces

molécules signal bactériennes et de produire en réponse des enzymes de quorum quenching et des molécules inhibitrices du QS (Loh, Pierson, et al. 2002) le terme de communication est-il vraiment adapté à ces interactions plantes-bactéries lorsqu'elles sont de nature pathogène ?

I-2-6-3-2 La communication entre les animaux et les bactéries

La production de l'AI-3 se ferait en réponse aux hormones des mammifères telles que l'épinéphrine et la norépinéphrine (Sperandio et al. 2003, Walters & Sperandio 2006). De plus l'AI-1 induirait également des modifications dans les cascades de signalisation intracellulaire des cellules épithéliales de l'intestin de mammifères (Holm & Vikström 2014).

Mais ces interactions bactéries-mammifères et bactéries-plantes se font souvent dans le cadre de la pathogénicité (Hughes & Sperandio 2008) et impliquent donc le système immunitaire de l'hôte et l'activation de quorum quenching et d'inhibition du QS. Donc peut-on réellement parler de communication entre règnes ? (Diggle et al. 2007)

I-2-7 Influence de l'environnement et concept de quorum sensing

Le QS est basé sur les densités cellulaires et moléculaires, mais celles-ci sont fortement impactées par l'environnement des bactéries. En effet, dans l'environnement naturel les communautés bactériennes peuvent se développer sur différentes surfaces, dans des milieux plus ou moins confinés, dans diverses matrices (eau, air, terre, hôte...), à différents pH et températures, de l'organisation dans l'espace des membres de la colonie bactérienne, de leur mouvement/déplacement... Tous ces paramètres abiotiques peuvent influencer positivement ou négativement l'effet du quorum sensing. En effet si la colonie se situe dans un endroit confiné limitant la diffusion des molécules signal un quorum artificiel (ne nécessitant que peu de cellules) sera plus rapidement et facilement atteint que si ces dernières se développent dans un milieu ouvert où les AI seront rapidement dilués dans l'environnement même si la densité cellulaire est élevée. D'où les notions de "Diffusion Sensing" (Redfield 2002) et "Efficiency Sensing" (Hense et al. 2007) qui sont apparues au cours des années 2000 (**Tableau 2**) (Alberghini et al. 2009).

La notion de "Diffusion Sensing" ou DS est indépendante de la densité cellulaire ainsi que de leur distribution spatiale, elle est basée sur le fait que les bactéries en tant qu'individus peuvent percevoir autour d'elles-mêmes un espace de diffusion en relarguant des molécules diffusibles qui leur permettent de tester, d'appréhender le milieu environnant pour voir s'il est utile ou non de produire des métabolites coûteux en énergie (Redfield 2002). Cette notion

n'implique absolument pas de comportement social de la part des bactéries, les réduisant à l'état d'individus solitaires et égoïstes. Cette chercheuse prône l'arrêt de l'anthropocentrisme exacerbé dont l'Humanité fait preuve en transposant le modèle de fonctionnement de notre société aux autres organismes peuplant la Terre.

Le concept d' "Efficiency Sensing" ou ES combine ceux du QS et du DS. Ceci implique que les bactéries sont capables d'évaluer la densité et la distribution spatiale de leur population, ainsi que les flux qui induisent un transfert de matière ou de masse, mais qu'elles ne peuvent pas faire la distinction entre ces deux paramètres. Ces paramètres ne sont donc pas couplés et ils peuvent varier indépendamment. Toutes les molécules relarguées dans le milieu seront soumises aux mêmes conditions, donc la production de molécules signal en premier lieu permet de ce fait, d'activer la production de métabolites plus coûteux en énergie si les conditions sont favorables (densité de molécules signal suffisante) (Hense et al. 2007).

Il est donc nécessaire de prendre en compte que la théorie du quorum sensing a été pensée pour des bactéries présentes dans un milieu confiné, homogène, statique et que les cellules ont une répartition resserrée et régulière dans l'espace, ce qui n'est probablement pas le cas dans l'environnement naturel (Horswill et al. 2007). Il apparaît donc judicieux de nuancer ce concept, en prenant en compte l'hétérogénéité du milieu naturel (Alberghini et al. 2009, Boyer & Wisniewski-Dyé 2009). De plus, toutes les molécules diffusibles ne sont pas des molécules signal (Winzer et al. 2002, Diggle et al. 2007) !

D'autres auteurs pensent clairement que le quorum sensing est la preuve irréfutable de l'existence d'une société microbienne d'où le concept de sociomicrobiologie (Crespi 2001). En effet, de nombreux chercheurs suggèrent que la communication cellule à cellule chez les bactéries, lorsqu'elles sont en forte densité cellulaire, leur permet d'œuvrer ensemble dans un objectif commun: la survie de leur communauté (Stevens et al. 2012, Darch et al. 2012). Cette communauté bactérienne étant multispécifique et pour cela il existe des molécules signal intra et inter-spécifique (Bassler 1999).

Tableau 2 : Comparaison des théories du quorum sensing, du Diffusing Sensing (DS) et de l'Efficiency Sensing (ES) (Alberghini et al. 2009).

Table 1 | **Quorum sensing, diffusion sensing and efficiency sensing**

Concept	Hypothesis		
	QS	DS	ES
How cells sense	Individual cells emit small diffusible autoinducer molecules that are sensed by themselves and others, leading to regulation of gene expression. We refer to the mechanism of sensing as autoinducer sensing if we do not want to imply what and why cells sense and who benefits from this.		
What cells sense	Cell density (or, less accurately, the cell number). An ensemble property on the population scale, not only defined at the positions of individual cells.	Mass-transfer properties of the environment surrounding a focal cell. Independent of cell density and spatial distribution.	A combination of cell density, mass-transfer properties and spatial cell distribution as the cell cannot determine density, mass transfer or clustering alone.
Why cells sense	To detect situations in which cell density is sufficient to make a coordinated response of a group of cooperating cells worthwhile.	To detect situations in which mass transfer is sufficiently limited for single cells to respond by producing extracellular diffusible effectors.	To estimate the efficiency of producing extracellular diffusible effectors and to respond only when this is efficient*.
Benefit	Hypothesis suggests QS evolved because of group fitness benefits.	Hypothesis suggests DS evolved because of individual fitness benefits, making DS a simpler hypothesis than QS.	Hypothesis suggests ES evolved because of both individual and group fitness benefits. Both work in the same direction, yielding broader conditions under which ES would be selected for.

* In efficiency sensing, the ecologically relevant information is the combination of all factors that affect autoinducer and effector concentrations in the same way. Cooperative sensing and effector production unavoidably emerge if more than one cell with the same autoinducer system is present. DS, diffusion sensing; ES, efficiency sensing; QS, quorum sensing.

I-2-8 Quels mécanismes de quorum sensing bactérien sont retrouvés dans les différents écosystèmes marins ?

Initialement, le quorum sensing a été découvert dans l'environnement marin (Nealson et al. 1970). Puis, les recherches sur ce mécanisme se sont tournées vers l'étude du QS chez des souches d'intérêt médical et agronomique pour des raisons économiques, délaissant l'étude de ce système chez les bactéries environnementales (Decho et al. 2010). Cependant l'étude de ce mécanisme dans l'environnement naturel, et dans l'environnement marin peut permettre de découvrir de nouvelles molécules signal et de nouvelles activités bactériennes régulées par le QS. Les différents écosystèmes composant l'environnement marin abritent une grande diversité bactérienne, atteignant de fortes densités cellulaires, capable d'interagir et de communiquer en utilisant les mécanismes de quorum sensing.

I-2-8-1 Le QS chez bactéries libres de la colonne d'eau

La présence de bactéries capable de QS basé sur les AI-1 dans le bactérioplancton a été mise en évidence par l'étude du génome de la *Rhodobacteraceae* *Silicibacter pomeroyi* (Moran et al. 2004). Puis, les genres *Jannaschia* et *Oceanibulbus* appartenant à la même famille ont montré leur capacité à produire des AI-1 (Wagner-Döbler et al. 2005). Par ailleurs,

certaines bactéries composant le bactérioplancton ont aussi au cours de leur cycle de vie une phase où elles vivent attachées à des particules inertes ou non (Ghiglione et al. 2007, Crespo et al. 2013) une caractéristique propice au fonctionnement par QS.

I-2-8-2 Le QS chez les bactéries attachées

La communauté bactérienne de la neige marine s'organise souvent sous forme de biofilm, dans lequel une densité cellulaire et moléculaire élevée est atteinte (Grossart et al. 2003), soit environ 10^8 à 10^9 bactéries par mL (Gram et al. 2002). Les bactéries attachées aux particules de neige marine (Li et al. 2015) sont capables de communiquer grâce au mécanisme de quorum sensing basé sur les AI-1. L'étude de Gram et ses collaborateurs s'est focalisée sur la communauté bactérienne attachée à la neige marine en mer de Wadden. Elle a pu mettre en évidence qu'une bactérie membre de la famille des *Oceanospirillaceae* et pour la première fois trois *Rhodobacteraceae* étaient capables de produire des AI-1 (Gram et al. 2002). Certains membres de la famille des *Rhodobacteraceae* utilisent également le TDA comme molécule de communication (Geng & Belas 2010, Berger et al. 2011). De plus, une *Enterobacteriaceae* provenant de la mer de Chine et vivant sur la neige marine vient d'être caractérisée pour la production d'AI-1, et suggère une possible régulation de la synthèse d'enzymes extracellulaires hydrolytiques par ce mécanisme de QS (Jatt et al. 2015). Un travail précédent suggère aussi l'implication du QS basé sur les AI-1 dans le contrôle de l'expression des enzymes hydrolysant la neige marine. La neige marine étant en partie constituée de carbone organique particulaire, son hydrolyse la rendrait assimilable par les bactéries, ce qui impacte indirectement le cycle biogéochimique du carbone (Hmelo et al. 2011).

I-2-8-3 Le QS dans la communauté bactérienne du sédiment

Les bactéries benthiques excrètent des polymères extracellulaires ou EPS (Extracellular Polymeric Substances) qui jouent un rôle dans l'adhésion des bactéries aux surfaces, ainsi que dans la mobilité et représentent une quantité de matière organique importante (Bertrand et al 2011). La production des EPS est gouvernée chez des souches non issues du sédiment par le QS (Marketon et al. 2003). De plus, des bactéries du sédiment qui sont capables d'inhiber le QS ont été mises en évidence (Khadar et al. 2011). Ces indices nous laissent penser que les bactéries vivant dans le sédiment marin utilisent des mécanismes de QS pour réguler certaines de leurs activités physiologiques.

I-2-8-4 Le QS chez bactéries associées au plancton

Le phytoplancton vit en association avec une communauté bactérienne riche et diversifiée. Cette dernière profite des nutriments apportés par le phytoplancton lorsqu'il libère dans le milieu extérieur ses déchets métaboliques. Là encore, les bactéries sont en densité cellulaire suffisante pour amorcer le mécanisme de quorum sensing. A ce jour, on a recensé des bactéries en association avec divers organismes composant le plancton.

Les Diatomées possèdent une communauté bactérienne associée avec laquelle, elles ont des interactions à bénéfice réciproque qui leur permettent d'accéder à des vitamines produites par leurs bactéries associées (Amin et al. 2012, 2015, Limardo & Worden 2015). De plus une molécule de type indole, l' IAA (indole-3-acetic acid), ainsi que les AI-1 sécrétés par les bactéries permettraient une communication inter-domaines (Amin et al. 2015).

La communauté bactérienne associée aux Dinoflagellés produit des AI-1, comme par exemple les *Rhodobacteraceae* des genres *Sulfitobacter* et *Roseovarius* qui ont été échantillonnées en mer de Wadden (Wagner-Döbler et al. 2005). Des Dinoflagellés comme *Prorocentrum lima* vivent en association symbiotique avec l'*Alpha-Proteobacteria* *Dinoreosebacter shibae*. Cette *Rhodobacteraceae* émet plusieurs AI-1 à longue chaîne du type C18-HSL, C15-HSL, qui reseraient impliqué dans la régulation du système de sécrétion de type 4 ou TSS4 qui est connu pour être impliqué dans la virulence de certaines bactéries (Patzelt et al. 2013).

Des Cyanobactéries comme *Trichodesmium* sont associées à des bactéries hétérotrophes qui à l'aide du mécanisme de QS basé sur les AI-1 et AI-2, réguleraient l'accès au phosphate et au phosphore organique dissout par la cyanobactérie (Van Mooy et al. 2012).

Certaines bactéries associées à des *Haptophyceae* (Nealson & Hastings 2006) sont capables de réaliser le QS basé sur les AI-1, AI-2 et CAI. Les "Milky seas" sont une spectaculaire manifestation du quorum sensing produit par des bactéries du genre *Vibrio* en association avec des haptophytes du genre *Phaeocystis*. En effet De plus, comme énoncé précédemment, la régulation du phénomène de bioluminescence chez les bactéries marines de l'espèce *Vibrio harveyi* est basé sur trois voies de QS interconnectées : les AI-1, AI-2 et CAI.

I-2-8-5 Le QS chez les bactéries associées aux macro-algues

Les spores de l'algue verte *Ulva* se dispersent selon le gradient d'AI-1 émis par une colonie bactérienne. Ces spores sont attirées par le lieu où elles vont s'établir en fonction de la concentration en AI-1 libérés par les bactéries déjà présentes. Les algues s'établissent à proximité de bactéries capables de produire des AI-1 (Tait et al. 2005). Cette étude est également un parfait exemple de communication entre les règnes du vivant.

De nombreuses bactéries se développent sur les algues brunes du genre *Colpomenia* entraînant une compétition entre bactéries pour les ressources (espace et nutriments). Certaines d'entre elles émettent des composés inhibant le QS de leurs concurrentes (Kanagasabhapathy et al. 2009). Le genre *Laminaria* possède également une bactérie de la famille des *Rhodobacteraceae* capable d'émettre des AI-1 à longue chaîne du type C16-HSL avec ou sans insaturation dans la chaîne acyle (Wagner-Döbler et al. 2005).

L'algue rouge *Gracilaria* possède des bactéries épiphytes et endophytes, parmi lesquelles certaines appartiennent au phylum des *Proteobacteria* et produisent des AI-1. La présence de ces AI-1 dans le milieu augmente significativement la libération de carpospores par l'algue rouge (Singh et al. 2015).

I-2-8-6 Le QS chez les bactéries associées aux plantes

Le thalle des angiospermes marins tel que celui des herbiers de posidonies (*Posidonia oceanica*) est également colonisé par de nombreux micro-organismes dont des bactéries appartenant aux classes des *Proteobacteria* (*Alpha*, *Béta* et *Gamma*), ainsi qu'aux *Bacteroidetes* (Garcias-Bonet et al. 2012). De nombreuses *Proteobacteria* utilisent le mécanisme de QS comme moyen de communication et de coordination cellulaire au sein de leur communauté (Case et al. 2008). On soupçonne donc que certaines proteobactéries associées aux herbiers de posidonie produisent des molécules signal dont les AI-1.

I-2-8-7 Le QS chez les bactéries associées aux invertébrés marins

Il a été démontré que les bactéries vivant en association avec le corail sont capables d'émettre des AI-1 au niveau de sa couche muqueuse, mais également des enzymes et molécules capables d'inhiber ces AI-1 en les modifiant (Golberg et al. 2011), ainsi que des AI-2. De plus, les AI-1 sont toujours présents lorsque le corail est atteint de blanchissement provoqué par une infection polymicrobienne (Zimmer et al. 2014).

Les éponges marines constituent un hôte permettant le développement des bactéries en densité cellulaire élevée. Des études ont mis en exergue la production d'AI-1 par les bactéries colonisant les éponges (Mohamed et al. 2008). Certaines bactéries associées aux éponges possèdent plusieurs voies analogues à luxI/luxR dans leur génome, ce qui leur permettrait d'adapter leur mode de vie fixe ou mobile (Zan et al. 2012). Il a également été mis en évidence la production de DKP par les bactéries associées aux éponges marines, molécule signal capable d'activer les récepteurs de la famille LuxR (Abbamondi et al. 2014). La bactérie du genre *Pseudovibrio* (famille des *Rhodobacteraceae*) peut vivre en association avec des éponges marines et synthétise le TDA (Harrington et al. 2014).

Les crustacés peuvent être infectés par la bactérie pathogène *Vibrio campbellii* qui possède trois voies de quorum sensing (AI-1, AI-2 et CAI) lui permettant d'adapter la virulence à son hôte (Pande et al. 2013). De plus, grâce au QS, certains Vibrios régulent leur capacité à utiliser la chitine, composant principal de l'exosquelette des crustacés, comme source nutritive (Sun et al. 2015).

Comme souligné plus haut (partie I-2-1), un exemple très connu d'expression du quorum sensing par une bactérie en association avec métazoaire est celui de la symbiose entre *Vibrio fischeri* et le céphalopode *Euprymna scolopes* (Verma & Miyashiro 2013). Les bactéries bioluminescentes sont hébergées et nourries à l'intérieur du photophore de l'animal, ce qui leur permet d'atteindre la densité cellulaire nécessaire à l'activation du QS puis de la bioluminescence, qui permet à l'animal de jouer avec les reflets du soleil et se camoufler.

I-2-8-8 Le QS chez les bactéries associées aux vertébrés marins

La bactérie *Vibrio fischeri* citée comme exemple dans le paragraphe précédent est aussi décrite vivant en association avec certains poissons abyssaux tel que *Melanocetus jhonsoni*, chez qui, elle émet de la bioluminescence (Haygood et al. 1992). Cependant aucune étude ne s'est focalisée sur la diversité bactérienne associée aux vertébrés marins et sa capacité à utiliser le mécanisme de QS.

I-3 Les objectifs et les méthodes de ce travail de recherche

I-3-1 Les objectifs de cette thèse de doctorat

Bien que découverts dans l'environnement marin, chez *Vibrio fischeri*, les mécanismes du quorum sensing ont été principalement élucidés chez des bactéries d'intérêt agronomique ou médical. Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, quelques études centrées sur des souches cultivables issues de zones géographiques limitées, ont montré l'importance du quorum sensing dans la physiologie de ces souches capables de communiquer. Pourtant l'importance de cette communication chez ces procaryotes, la diversité des médiateurs chimiques émis, la fonction du quorum sensing chez ces microorganismes restent très mal connues et évaluées, et en particulier en milieu marin. Ainsi, ce travail s'inscrit dans le thème de l'étude du quorum sensing dans l'environnement marin, avec pour question centrale :

Quelle est la diversité moléculaire et génétique des autoinducteurs et des gènes codant les Auto-Inducteur synthèses impliqués dans les mécanismes de quorum sensing chez les bactéries vivant dans l'environnement marin ? Cette étude est divisée en trois axes:

Quelle est la diversité taxonomique et moléculaire des bactéries marines cultivables communiquant grâce au mécanisme de QS basé sur les AI-1 ?

Afin de répondre à cette question, nous avons criblé une grande souchothèque de bactéries marines pour leur capacité à communiquer. Nous avons évalué de la diversité taxonomique et moléculaire des bactéries marines cultivables émettant des signaux moléculaires de type AI-1 en utilisant la collection de bactéries marines MOLA qui regroupe des isolats bactériens provenant de tous les océans et de divers écosystèmes marins. Ce travail nous a permis d'identifier plusieurs souches originales pour la production d'AI-1 dont la bactérie oligotrophe *Maribius* sp. MOLA 401. Nous avons montré la capacité de cette souche à émettre une très grande diversité d'AHLs, probablement plus que chez aucune autre bactérie déjà décrite. Nous avons aussi obtenus plusieurs indices forts et concordants que certaines de ces AHLs émises ont des structures originales.

→ ARTICLE (Draft avancé, soumission mars 2016) 1 : **Doberva M.**, Stien D, Hue N, Sanchez-Ferandin S, Eparvier V, Lebaron P, Lami R. Soumission envisagée à ChemBioChem. Large diversity and original structures of acyl-homoserine lactones in *Maribius* sp. MOLA 401, an oligotrophic marine *Roseobacter* bacteria.

Cependant, il a été estimé que moins de 1% des bactéries marines sont cultivables avec les techniques actuellement disponibles. De plus la fraction non-cultivable des bactéries marines n'a jamais été étudiée pour cette caractéristique. Je me suis donc posée la question :

Quelle est la prévalence du QS basé sur les AI-1 et -2 chez les bactéries (cultivables et non-cultivables) de la colonne d'eau océanique ?

Pour répondre à cette question nous avons criblé une base de données métagénomiques marines, celle du GOS (Global Ocean Sampling) afin de rechercher la présence de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des AI-1 et AI-2 chez les bactéries cultivables et non cultivables.

→ ARTICLE (Publié) : **Doberva M**, Sanchez-Ferandin S, Toulza E, Lebaron P, Lami R (2015) Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling metagenomic database. *Aquat Microb Ecol* 74:107-119

Enfin, la régulation de plusieurs fonctions bactériennes a récemment été attribuée au QS basé sur les AI-1. De plus de nombreux membres de la famille des *Rhodobacteraceae* qui est très abondante dans l'environnement marin sont capables de QS sans que l'on connaisse la fonction régulée. Nous avons donc amorcé une troisième problématique :

Quel est le rôle fonctionnel du QS chez les *Roseobacter* dans l'environnement marin ?

Celle-ci vise à comprendre le rôle fonctionnel des AI-1 dans l'environnement marin en suivant d'une part, l'expression du gène *luxI* des bactéries appartenant à la famille des *Rhodobacteraceae* en fonction des paramètres biotiques et abiotiques du milieu marin et d'autre part, l'implication du gène *hdtS* dans l'ensemble des AHLs produites par plusieurs souches marines issues du phylum des *Proteobacteria*.

I-3-1-1 Quelle est la diversité taxonomique et moléculaire des bactéries marines cultivables utilisant le QS basé sur les AI-1 ?

La collection MOLA (<http://collection.obs-banyuls.fr/>; WDCM911) a été créée en 2001 et est référencée au niveau mondial (World Federation for Culture Collection). Actuellement, plus de 3500 souches sont maintenues cryoconservées à -80°C. Les souches ont été isolées à partir d'échantillons provenant de nombreuses campagnes océanographiques autour des océans du globe à partir d'environnements très variés, d'hyper-oligotrophes à eutrophes, à l'interface air-mer, dans la colonne d'eau, ou à partir de sédiments, en association

avec des animaux, des algues, ou encore des plantes marines. La diversité de cette collection est remarquable : elle représente huit phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobiae*, *Planctomycetes* et *Actinobacteria*), 15 classes et une centaine de familles taxonomiques. Enfin plusieurs centaines de souches restent originales d'un point de vue génétique.

Les bactéries Gram négatives seraient majoritaires dans l'environnement planctonique (Glöckner et al. 1999) et les proteobactéries domineraient les communautés microbiennes marines (Giovannoni & Rappé 2000). De plus dans les différents écosystèmes marins elles atteignent des densités cellulaires élevées. Comme cela a été montré au cours de cette introduction, les protéobactéries sont connues pour utiliser les mécanismes de QS afin de réguler et coordonner leurs activités. Les protéobactéries de la collection MOLA, soit environ 1000 souches, ont donc été criblées pour évaluer la diversité taxonomique de celles qui émettent des AI-1, ainsi que caractériser la diversité chimique des AI-1 émis.

Mais ce premier axe étant basé sur des souches bactériennes cultivables, cela représente donc moins de 1% des bactéries marines (Amann et al. 1995), nous avons donc choisi pour compléter cet axe d'utiliser également une méthode indépendante des techniques de cultures et donc d'explorer une base de données métagénomique marine.

I-3-1-2 Quelle est la prévalence du quorum sensing basé sur les AI- et -2 chez les bactéries marines ?

Afin de compléter l'axe précédent, c'est-à-dire cribler la fraction non cultivable des bactéries marines, nous avons choisi d'explorer une banque de données méta-génomique marine : celle du GOS (Global Ocean Sampling) (Venter et al. 2004). La base de données du GOS a été réalisée grâce au séquençage massif d'échantillons avec la méthode de Sanger (Parthasarathy et al. 2007). Le GOS fut une expédition océanographique qui avait pour but de réaliser des métagénomes marins, en échantillonnant la colonne d'eau océanique à 68 stations différentes réparties dans les divers océans de la planète (**Figure 28**). Une fois l'ADN de tous les échantillons extrait et séquencé, les séquences d'ADN ont été mises à disposition sous forme de base de données représentant 6,3 milliards de paires de bases (Rusch et al. 2007) et le protéome prédit aussi, soit 6,12 millions de séquences protéiques (Yooseph et al. 2007). La banque de données du GOS constitue donc l'une des plus grandes banques de données métagénomique marine disponible.

Cette base de données a été utilisée dans cette thèse pour évaluer la présence de gènes codants les enzymes principales des voies de biosynthèse des AI-1 et AI-2, soit les quatre familles de gène *luxI*, *ainS*, *hdtS* et *luxS* chez les bactéries vivant dans la colonne d'eau des différents océans.



Figure 28 : Carte géographique du GOS. Les différentes stations de prélèvement sont représentées par les points rouges et verts.

I-3-1-3 Quel est le rôle fonctionnel du QS chez les *Rhodobacteraceae* dans l'environnement marin naturel ?

Après deux premières parties de descriptions et d'évaluation de la diversité génétique, taxonomique et moléculaire, nous avons amorcé deux expérimentations pour essayer de comprendre le rôle des AI-1 et l'influence de l'environnement marin sur ces derniers. D'une part des jeux d'amorces visant les gènes de la famille des *luxI* chez différents genres ont été mises au point chez des souches cultivables ainsi que sur des extraits d'ADN environnementaux. A terme, cela permettra de suivre l'expression du QS basé sur les AI-1 dans des contextes environnementaux particuliers comme par exemple les blooms phytoplanctoniques. D'autre part, une expérience d'expression hétérologue du gène *hdtS* chez différentes souches marines est en cours de réalisation, ce qui nous permettra de vérifier si les gènes codant des AHL synthases appartenant à la famille des HdtS, issues de bactéries marines permettent la production des AHLs.

Ce travail a été amorcé, mais le temps dédié à la thèse n'a pas permis encore de le finaliser. Cependant des résultats prometteurs et novateurs ont dorénavant déjà été obtenus et seront présentés pour quelques uns d'entre eux dans la partie discussion.

Certains éléments de cette question ont fait l'objet d'une valorisation annexe à cette thèse, sous forme de publication de drafts de génomes d'intérêt, ou sous forme d'une review sur la bioluminescence en milieu marin.

→ **Doberva M**, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Croue J, Suzuki M, Lebaron P, Lami R (2014) Genome Sequence of the Sponge-Associated *Ruegeria halocynthiae* Strain MOLA R1/13b, a Marine Roseobacter with Two Quorum-Sensing-Based Communication Systems. *Genome Announcements* : 00998-14

→ **Doberva M**, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Joux F, Lebaron P, Lami R (2014) Genome Sequence of *Maribius* sp. Strain MOLA 401, a Marine Roseobacter with a Quorum-Sensing Cell-Dependent Physiology. *Genome Announcements* :00997-14

→ **Doberva M**, Lami R, Lebaron P, Sanchez-Ferandin S. Ecology and Diversity of Bioluminescent Marine Microorganisms. Review.

I-3-2 Quelles techniques utiliser pour aborder les questions liées au quorum sensing en milieu marin ?

Les objectifs de cette étude nous ont amené à l'interface de plusieurs disciplines : la chimie des substances naturelles, de la génomique environnementale, de la microbiologie pasteurienne, et l'océanologie.

I-3-2-1 Les méthodes dépendantes des techniques de culture : de la microbiologie pasteurienne aux approches de chimie des substances naturelles

Pour étudier les bactéries marines et les molécules signal qu'elles synthétisent, il est possible de les cultiver en batch à l'aide de milieux de croissance adaptés tels que le Marine Broth ou le Marine Agar qui permettent la pousse d'une majorité de bactéries marines cultivables. Une fois les cultures obtenues, l'extraction de l'ADN des cellules est réalisée, et un séquençage partiel (gènes d'intérêt) ou bien complet du génome est effectué (**Figure 29**).

A partir de ces mêmes cultures, il est possible de détecter les molécules, et notamment les AI-1 et AI-2 grâce à des souches biosenseurs dites rapportrices qui émettent un signal (lumineux, fluorescent ou de couleur selon les souches) si la molécule recherchée est présente. Il existe plusieurs types de souches bactériennes rapportrices de la présence d'AI-1 qui sont

sensibles à la longueur de la chaîne acyle des AI-1 (Steindler & Venturi 2007). Le gène de la famille des *luxI* de ces souches rapportrices est inactif, et le gène *luxR* est couplé à un gène rapporteur. Par exemple la souche rapportrice *Chromobacterium violaceum* CV026 repère préférentiellement les AI-1 de type C6-HSL et y répond par une coloration violette (McClean et al. 1997), *Pseudomonas putida* F117 (pKR-C12) émet un signal fluorescent (GFP ou green fluorescent protein) lorsqu'elle est activé par l'AI-1 à chaîne longue (Steidle et al. 2001), *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 produit un pigment bleu lorsque des AHLs sont présentes, puisqu'il possède le système β -galactosidase (Fuqua & Winans 1996) *Escherichia coli* MT102 (pJBA-132) lorsqu'il détecte des AI-1 à chaîne courte émet aussi une luminescence (Andersen et al. 2001) et enfin *Vibrio harveyi* BB170 émet de la luminescence en présence d'AI-2 (Bassler et al. 1993). Les souches rapportrices capables de détecter les AI-1 peuvent également réagir et émettre un signal en présence d'AHLs inconnues. De plus, on peut ensuite extraire ces molécules d'intérêt et les caractériser à l'aide de techniques de chimie (**Figure 29**) (Li et al. 2006, Fekete et al. 2007, Wang et al. 2011) telles que l'UHPLC-MS (chromatographie liquide à ultra haute pression chromatographie liquide couplé à de la spectrométrie de masse).

Les méthodes dépendantes des techniques de culture donnent accès à un grand nombre d'informations sur les souches bactériennes utilisées mais elles comportent un biais, celui de la cultivabilité de la bactérie, étant donné que moins de 1% des bactéries marines sont cultivables (Amann et al. 1995). Il est donc nécessaire d'utiliser également des méthodes indépendantes des techniques de culture.

I-3-2-2 Les méthodes indépendantes des techniques de culture : les approches de génomique environnementale

Les méthodes indépendantes des techniques de culture permettent d'accéder à la fraction non cultivable des bactéries. Ces approches dites de génomique environnementale consistent en l'étude des séquences d'ADN extraites d'un écosystème à un moment donné. Ces séquences d'ADN sont ensuite extraites, séquencées et mises à disposition. A partir de cet ADN, il est possible:

- d'évaluer la diversité taxonomique et/ou fonctionnelle de l'échantillon en amplifiant par PCR un gène marqueur de la taxonomie (**Figure 29**) puis en réalisant soit un phylotypage par les techniques de DGGE (Denaturing Gel gradient Electrophoresis) ou RFLP (Restriction

Lengh Polymorphism) soit un séquençage des amplicons du gène ciblé (taxonomique ou fonctionnel) puis en construisant un arbre phylogénétique afin de représenter la diversité.

- d'exprimer de l'ADN métagénomique dans des systèmes vecteur/hôte, afin de constituer et cribler des banques de clones pour des activités biologiques ou la production de molécules d'intérêt (**Figure 29**).

- de séquencer directement (sans étape préalable d'amplification) par la technique de shotgun, et rassembler la totalité des séquences d'ADN obtenues dans une bases de données (**Figure 29**) (Venter et al. 2004). Par exemple la base de données du GOS a été conçue ainsi en utilisant la méthode dite de séquençage Sanger (Parthasarathy et al. 2007). Cette base de données métagénomiques marines permet d'avoir accès aux métagénomes de 68 stations réparties entre tous les océans. Il est ensuite possible de rechercher la diversité taxonomique et fonctionnelle de nos gènes d'intérêt en couvrant la zone géographique la plus large possible par rapport aux autres techniques, comme cela a été réalisé pour d'autres études (Zhang & Gladyshev 2008, Yilmaz et al. 2012, Toulza et al. 2012) et surtout sans à priori lié aux choix d'amorces PCR (contrairement aux approches dépendantes de la PCR). Les techniques de bio-informatiques mises point ces dernières années permettent de cribler ces gigantesques banques de données, et d'en extraire des informations ciblées.

Enfin, à l'aide des techniques de biologie moléculaire telles que les PCR, Q-PCR, RT-Q-PCR, on peut suivre directement, sur des extraits d'ADN et d'ARN environnementaux, la présence, l'abondance et l'expression de nos gènes d'intérêt. Il est alors possible de tenter de corréler les résultats avec les paramètres environnementaux biotiques et abiotiques tels que la température, le pH, la chlorophylle... afin de vérifier l'influence de ces derniers sur la présence et l'expression des gènes d'intérêt ou bien des transcrits associés.

Les méthodes dépendantes et indépendantes des techniques de cultures sont donc complémentaires. Une utilisation conjointe permet de bénéficier d'une vue d'ensemble du mécanisme de QS dans l'environnement marin.

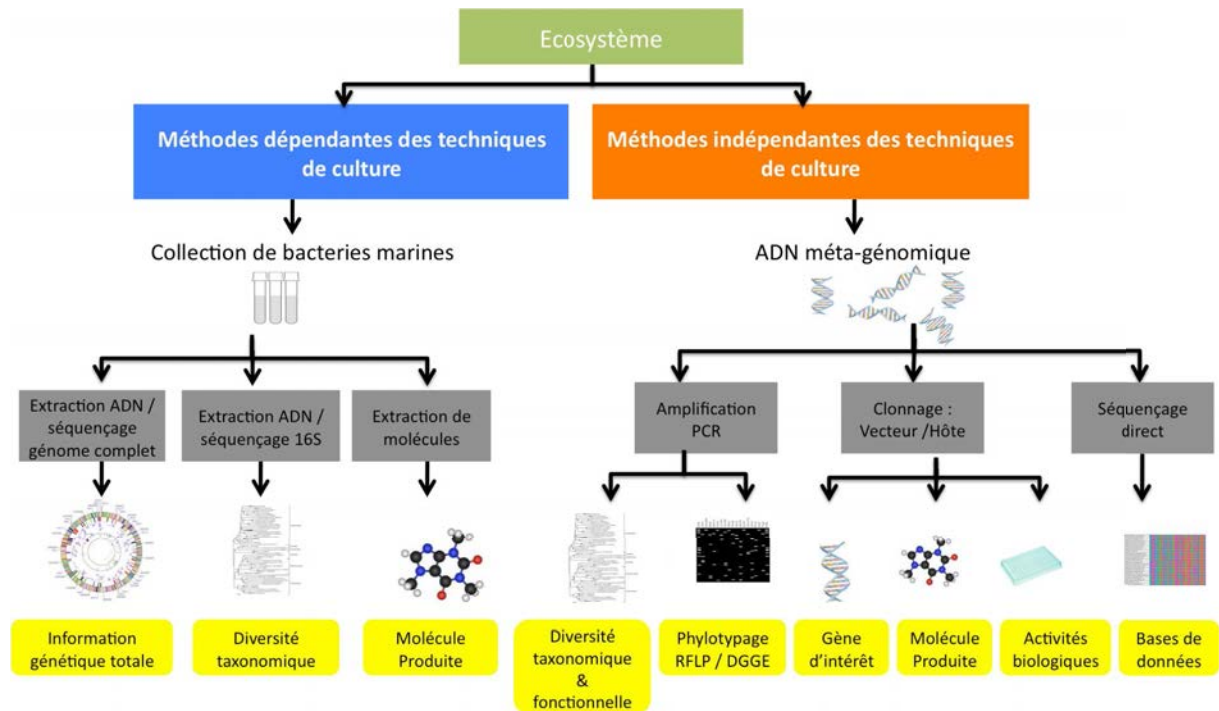
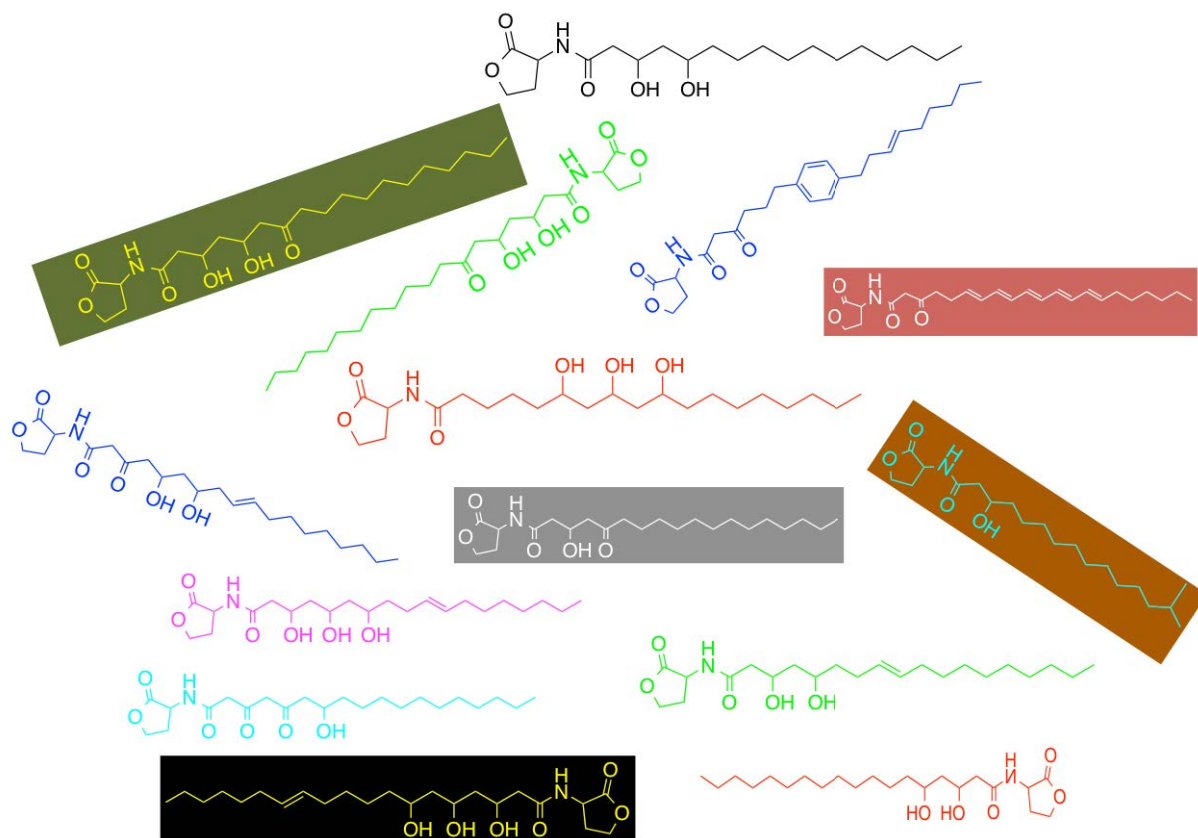


Figure 29 : Comparaison des méthodes dépendantes et indépendantes des techniques de culture.

Pour tenter de répondre à la question centrale de ce travail de thèse, les trois chapitres qui vont suivre sont rédigés sous forme d'article scientifique. Le premier chapitre traite de l'ensemble des AHLs produites par la bactérie marine issue d'un milieu oligotrophe *Maribius sp* MOLA 401. Elle répond à la problématique : une bactérie marine vivant dans un environnement oligotrophe utilise-t-elle un mécanisme de communication cellule à cellule comme le QS basé sur les AI-1 ? La seconde publication est relative au criblage de la banque de données métagénomiques du GOS dans le but d'évaluer la présence des Auto-Inducteurs synthèses dans le milieu marin. Il répond à la question quelle est la prévalence des Auto-Inducteur synthèses dans l'environnement marin ? Enfin, ce manuscrit de doctorat se termine par une discussion générale où les principaux résultats sont mis en perspective.

Chapitre II :



Large diversity and original structures of
acyl-homoserine lactones in *Maribius* sp.

MOLA 401, an oligotrophic marine
Roseobacter bacteria

Chapitre II : Publication : Large diversity and original structures of AHLs in *Maribius* sp MOLA 401, an oligotrophic marine *Roseobacter* bacteria

Large diversity and original structures of acyl-homoserine lactones in *Maribius* 0 MOLA 401, an oligotrophic marine *Roseobacter* bacteria

DOBERVA Margot¹, STIEN Didier¹, HUE Nathalie³, SANCHEZ-FERANDIN Sophie²,
EPARVIER Véronique³, LEBARON Philippe¹ and LAMI Raphaël^{1,*}

To be submitted to ChemBioChem

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Biologie Intégrative des Organismes Marins (BIOM), Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

³ Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 1, av. de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France

*Corresponding author: raphael.lami@obs-banyuls.fr

Keywords: Quorum sensing, Acyl-homoserine lactone, Marine bacteria, *Roseobacter*.

running title : AHLs production by *Maribius*.

The authors declare no conflict of interest

Abstract

Quorum sensing (QS) is a density-dependant mechanism allowing bacteria to synchronize their genetic expression, enhancing the coordination of their physiological activities. This cell-to-cell signalling pathway is mediated by a wide range of signalling molecules among which *N*-acyl-homoserinelactones (AHLs or AI-1 : autoinducers type 1), produced by *Proteobacteria*. Quorum sensing and AHL-based communication systems have been identified in many marine bacterial strains, mainly isolated from biofilms, eutrophic environments or associated to microalgae. However, bacterial densities in oligotrophic environments ($\sim 10^5$ cells per ml) are below the expected thresholds that enable QS. In this study, we examined the diversity of AI-1 produced by *Maribius* sp. MOLA 401 an oligotrophic *Alphaproteobacteria* which belongs to the *Roseobacter* clade. To analyze the AHL production of this marine strain, we combined biosensors-based screening with liquid chromatography and mass spectrometry. We were surprised to detect 21 different AHLs emitted by this strain. Also, some of these AHLs presented original features, including long (C15 to C21) and poly-hydroxylated acyl side chains. Collectively, these results suggest that quorum sensing could be a major physiological trait of oligotrophic *Roseobacter*.

Introduction

Quorum sensing (QS) is a cell-to-cell bacterial communication mechanism, allowing bacteria to sense their population density (Nealson 1977) and coordinate their gene expression levels (Bassler 1999, Fuqua & Greenberg 2002) and physiological activities (Miller & Bassler 2001). To perform quorum sensing-based communication, bacteria produce, secrete and accumulate small molecules in the nearby environment (Atkinson & Williams 2009). As the cell density increases, the concentration of these molecules increases, and when a given threshold concentration is reached, targeted bacterial partners can respond to these compounds and modify their gene expression, and thus their behaviour and phenotype (Withers et al. 2001, Bassler 2002). It has been shown that QS systems regulate and synchronize activities like biofilm production (Parsek & Greenberg 2005, Dickschat 2010), nodulation (Cha et al. 1998, Loh et al. 2002), bioluminescence (Waters & Bassler 2005), virulence factor production (Smith & Iglewski 2003) and many others (Diggle et al. 2007). The coordination of bacterial community activities conveys an ecological advantage to the population (Case et al. 2008).

Among the various molecular signals used in quorum sensing systems, AHLs (acyl-homoserine lactone or autoinducer type-1, AI-1) have been widely studied (Fuqua et al. 1994). AHLs are homoserine lactone (HSL) linked to fatty acyl chains through an amide bond. The acyl chain length can varies from 4 to 18 carbons, and presents sometimes a 3-oxo or a 3-hydroxy fonctionnal group (Fuqua & Greenberg 2002). It is usually saturated but some AHLs have unsaturation. AHLs are synthetized by enzymes called AHL-synthases. These enzymes are encoded by 3 groups of genes: *ainS*-like (Gilson et al. 1995), *luxI*-like (Engebrecht & Silverman 1984) and *hdtS*-like (Laue et al. 2000). *ainS*-like genes are found only in *Vibrio* genus. *luxI*-like genes are the most knew, and are present in a lot of

Proteobacteria genome (Gelencsér et al. 2012). *hdtS*-like are less well studied. AHL-synthases catalyse the amide bond formation between the acyl chain carried by the ACP (acyl carrier protein) and the amine moiety precursor SAM (S-adenosyl-methionine) (Parsek et al. 1999, Fuqua & Greenberg 2002).

Many marine bacteria regulate some of their physiological traits using these QS systems. Among them the *Roseobacter* (*Rhodobacteraceae* family), an abundant key bacterial clade in marine environments drives important biogeochemical reactions (Gram et al. 2002, Schaefer et al. 2002, Wagner-Döbler et al. 2005, Wagner-Döbler & Biebl 2006). *Rhodobacteraceae* are abundant in ocean waters and it has been demonstrated that 80% of completely sequenced genome, encode *luxI*-like genes (Cude & Buchan 2013, Zan et al. 2014). Furthermore, new AHLs have been described in marine *Roseobacter* strains (Schaefer et al. 2008, Thiel et al. 2009). Among the AHL-producing *Roseobacter*, *Ruegeria* species have been found associated with sponges (Mohamed et al. 2008, Zan et al. 2012, 2015), *Dinoroseobacter* species may live in association with a dinoflagellate (Patzelt et al. 2013), a *Sulfitobacter* sp. was associated with a diatom (Amin et al. 2015, Limardo & Worden 2015) and *Phaeobacter gallaeciensis* proliferates in coastal water column habitat (Berger et al. 2011). Interestingly, this list of *Roseobacter* habitats reveals that quorum sensing has been mainly identified in strains isolated in micro-environments or micro-niches where bacteria can reach high concentrations (phycosphere, sponges tissues). More generally, it is commonly thought that quorum sensing is not a major physiological trait in marine oligotrophic strains. Indeed, bacterial concentrations in oligotrophic environments (approximately 10^5 cells per mL) presumably do not reach sufficient density, and therefore do not reach the required threshold for establishing quorum sensing.

However, a few recent publications report the occurrence of quorum sensing in marine oligotrophic bacterial strains. In their pioneering work, Moran et al. (2004) have sequenced

the full genome of *Silicibacter pomeroyii*, an oligotrophic *Roseobacter*. Interestingly, the authors of this study underlined the presence of two quorum sensing systems. On one hand, they noticed that the presence of these genes contrast with the conservative metabolism of *Silicibacter pomeroyii*, adapted to stable oligotrophic environments. On the other hand, they noticed that the presence of quorum sensing genes is in line with the presence of 3 rRNA genes copies, and might reveal an adaptation for niche switching (from free-living to particle attached way of life) (Moran et al. 2004). Similarly, in a previous study, we detected many protein sequences affiliated to LuxI and HdtS (AHLs synthases) from oligotrophic environments in the Global Ocean Sampling metagenomic dataset (Doberva et al. 2015). Collectively, these preliminary observations suggest that quorum sensing could constitute an important physiological trait of oligotrophic *Roseobacter*. However, to our knowledge, no study had yet systematically inventoried the diversity of AHLs emitted by oligotrophic marine bacteria. In this study, we investigated the potential of an oligotrophic bacteria, *Maribius* sp. MOLA 401 to produce AHLs for quorum sensing.

The *Maribius* sp. MOLA 401 strain has been isolated in a tropical oligotrophic lagoon located in New Caledonia (France) (F.JOUX personal communication). A closely related strain (*Maribius pelagius* B5-6^T; 96% of 16S rRNA sequence identity) has been isolated in the oligotrophic Sargasso Sea (Atlantic Ocean) (Choi et al. 2007). We fully sequenced the genome of *Maribius* sp MOLA 401, and reported the presence of quorum sensing *luxI*, *luxR* and *hdtS* genes, revealing its potential to communicate (Doberva et al. 2014). Eventually, we embarked upon describing the AHLs produced by this strain using AHL biosensors and LC-MS analyses.

Materials & Methods

Culture of *Maribius* MOLA 401 strain

The *Maribius* MOLA 401 strain is from the MOLA culture collection, WDCM911; <http://collection.obs-banyuls.fr/index.php>). This strain has been isolated on December 3, 2004 at 4-m depth, from marine oligotrophic waters in the southwest lagoon of New Caledonia (France) (22°21.23'S/166°23.43' E) (F.JOUX personal communication). An initial culture was carried on 5 mL culture of *Maribius* sp. MOLA 401 and the supernatant was shown to activate the biosensor. Hence, the strain was cultivated in 3L of Marine Broth 2216 medium (BD Difco, Sparks, MD) at 25°C over 72h. The draft genome sequence has been published (Doberva et al. 2014) and had revealed the presence of quorum sensing genes *luxI*, *luxR* and *hdtS*.

Phylogenetic analyses of *Maribius* MOLA 401 16S rRNA and quorum sensing genes

Phylogenetic analyses were conducted to assess the *Maribius* quorum sensing gene position regarding the already published phylogenies, and to infer their hypothetical role for a few of them. Four different genes were considered: 16SrRNA, , *luxR* (encoding for an AHLs receptor), *luxI* (encoding for an AHLs synthase : enzyme of AHLs biosynthesis pathway) and *hdtS* (another gene encoding for an AHLs synthase : an acyltransferase involved in AHL synthesis). All alignments were performed using ClustalW (Larkin et al. 2007) in MEGA 6 software (Tamura et al. 2013) and adjusted manually. Phylogenetic trees were constructed using the Neighbor-Joining (NJ) method in MEGA 6 software for each kind of sequence alignments. NJ analyses were conducted with p-distance correction and 1000 bootstrap replicates.

AHLs standards used in this study

We used the following series of AHLs as standards in this study : *N*-butanoyl-homoserine lactone (C4-HSL), *N*-hexanoyl-homoserine lactone (C6-HSL), *N*-octanoyl-homoserine lactone (C8-HSL), *N*-(3-hydroxyoctanoyl)-homoserine lactone (HO-C8-HSL), *N*-(3-hydroxydecanoyl)-homoserine lactone (HO-C10-HSL), *N*-dodecanoyl-homoserine lactone (C12-HSL), *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone (oxo-C12-HSL), (*Z*)-*N*-(3-oxotetradec-7-enoyl)-homoserine lactone (oxo-C14:1-HSL), *N*-hexadecanoyl-homoserine lactone (C16-HSL), *N*-octadecanoyl-homoserine lactone (C18-HSL). AHLs were obtained from Cayman Chemical (Michigan, USA). Stock solutions (10 mmol/L) of the analytes were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO). Oxo-C14:1-HSL was dissolved in acetonitrile (CH₃CN).

Extraction of AHLs from *Maribius* sp. MOLA 401 supernatants

Maribius sp. was cultivated under aerobic conditions in 3L of MB in Erlenmeyer flasks (6 x 1 L), under continuous shaking (200 rpm, 25°C, 72h). When the culture reached stationary cell growth phase, 600 mL of tert-butyl methyl ether were added (6 x 100 mL). This mixture was shaken overnight at room temperature (150 rpm). The two phases were then separated, and the organic phase was dried with MgSO₄. Solvent was filtered and removed with a rotary evaporator. The crude extract (170.6 mg) was dissolved in HPLC-grade DMSO (57 mg/mL). A Phenomenex Strata C18, 55 µm, 5g column was equilibrated with CH₃CN (100 mL), H₂O:CH₃CN 75:25 (35 mL), then H₂O (100 mL). The crude extract dissolved in DMSO was deposited on top of the column. Elution was carried out with H₂O (50 mL), CH₃CN (50 mL) fraction M, and CH₂Cl₂:MeOH 50:50 (50 mL) fraction MG. Fractions M and MG (**Tableau 3**) were evaporated in a rotary evaporator yielding 40.6 mg and 11.0 mg of material respectively.

HPLC microfractionnement

Fraction M was dissolved in DMSO (40 mg/mL) and was fractionated on a separate HPLC system with 2 Varian Prep Star pumps, a manual injector, a Dionex Ultimate 3000 RS variable wavelength detector, and a Dionex Ultimate 3000 fraction collector. The column was a Phenomenex Luna C18, 5 μ m, 21.2 x 250 mm, and the flow rate was set to 20 mL/min. The solvent were gradient grade H₂O and CH₃CN (70:30 for 3 min, followed by a 12 min linear gradient from 70:30 to 0:100, followed by 100% CH₃CN for 10 min). The effluents were monitored at 214, 254, 274 and 280 nm, and were collected between 3 and 25 min (1 fraction/min, 22 fractions total referenced as M1-M22). The solvent was removed from each fraction with a genevac HT-4X system. Each fraction was dissolved with 100 μ L of DMSO to perform biosensor tests.

Culture of biosensor strains

Maribius culture supernatant (20 μ L), crude *Maribius* extract, fraction MG and the 22 fractions (M1-M22) were tested in the AHL biosensor assay following previously described protocols using *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli* based biosensors (Riedel et al. 2001, Andersen et al. 2001, Steindler & Venturi 2007). Briefly, *Pseudomonas putida* F117 (pRK-C12 ; Kmr; ppul::npt) was used for the detection of long-chain AHLs (Andersen et al. 2001) and *Escherichia coli* MT102 (pJBA132) for the detection of short chain AHLs (Riedel et al. 2001). *Escherichia coli* MT102 and *Pseudomonas putida* F117 were cultivated in Luria–Bertani Broth (Sigma L3022) with continuous shaking at 200 rpm. *Escherichia coli* MT102 was grown in LB supplemented with tetracycline (25 μ g/mL) at 37°C for overnight and the strain *Pseudomonas putida* F117 grown in LB supplemented with gentamicine (20 μ g/mL) at 30°C for overnight. A total of 200 μ L from an overnight culture of each biosensor strains was inoculated in 9.8 mL of fresh LB medium with the antibiotics adapted for each biosensor strains. To perform the test, 180 μ L of fresh biosensor culture were disposed in each well of a

96-well microplates. Then 20 μL of microfraction extract (at 10 mg/mL) were added in each wells (all measurements were performed in triplicate). Microplates were incubated at 30°C and 37°C depending of growth optimum of the selected biosensor strain, without shaking. After 0, 5 and 24 h of incubation, fluorescence was determined with a Victor1420 Multilabel Counter (Perkin–Elmer) at an excitation wavelength of 485 nm and a detection wavelength of 535 nm. OD620 was also measured to control biosensor cell growth. Negative controls were biosensor cultures without extract, and sterile LB medium. Biosensor cultures with addition of commercial AHLs (C6-HSL for *P. putida* F117 and oxo-C10-HSL for *E. coli* MT102) were used as a positive control.

LC-MS analyses

UHPLC-MS analyses were performed with a Waters (Milford, USA) Acquity UPLC-TQD (Triple Quadrupole Detector) system controlled by the MassLynx 4.1 software. Column was an Acquity HSS C18 (2.1 x 50 mm) with 1.8 μm particle size (Waters). The column oven was set at 40°C. The flow rate was maintained at 0.6 mL min⁻¹ and the injection volume was 2 μL . The mobile phase was composed of 0.1% formic acid in water (eluent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). A gradient profile was used, starting with 95% of A, keeping this composition constant for 0.5 min. Proportion of B was linearly increased to 100% in 6.5 min, and was left at 100% for 3 min.

The T.Q. Detector operated in ElectroSpray Ionization (ESI) in the positive and negative modes. First, the third quadrupole (Q3) has been used in scanning mode on the m/z 50 to 800 mass range in order to confirm the molecular weight and the purity of our ten standard AHLs (2 mg/mL in DMSO, 2 μL injected), but also to determine their retention time (RT) under our chromatographic conditions.

Two cone voltages (30 and 60 volts) were applied both in ESI⁺ and ESI⁻ modes. The other ion source parameters were as follows: capillary voltage 3.2 kV for positive mode (3 kV in negative mode), the source temperature was set at 150°C and the desolvation temperature was 450°C. Nitrogen was used as desolvation gas at a flow rate of 800 L h⁻¹ and as cone gas at a flow rate of 50 L h⁻¹. The analytical approach first involved the study of mass spectra obtained for our standard molecules. These compounds ionized significantly better in the positive mode, and the signal of the protonated molecule ([M+H]⁺) appeared more abundant when the cone voltage involved was lower. A peak corresponding to the cationized AHL with ubiquitous sodium ([M+Na]⁺) often had a significant intensity too. Applying a higher cone voltage led to fragmentation in the ion source. In particular, a fragment ion at *m/z* 102 was specific for the HSL moiety. This signal was then chosen as the specific ion indicating the presence of HSL-type compounds. In a second step the first quadrupole (Q1) of the TQD instrument was used in scanning mode from *m/z* 50 to 500 as mass range and several cone voltages (10, 15, 20 and 25 volts) were applied in order to determine the best value to observe the more intense [M+H]⁺ signal for each standard AHL. The [M+H]⁺ ions were later used as the precursor ion for MS/MS experiments. Each ion of interest was selected by the first quadrupole (Q1) and then focused in the collision cell (Q2) where fragmentation reactions occurred. The resulting fragment ions were finally analyzed by the third quadrupole (Q3). The collision gas (argon) was introduced into the collision cell to maintain a pressure near to 4.5x10⁻³ mbar. The collision energy was optimized to lead to an attenuation of the precursor ion beam of almost 85%. The fragmentation pattern of each [M+H]⁺ standard ion (MS/MS spectrum) has been recorded with the most suitable parameters for a later comparison with those obtained for the signals of interest observed in samples.

MS/MS spectra description

In the 11 active fractions 21 AHLs were detected. $[M+H]^+$ ion and fragmentation data are reported in the next table 4.

Tableau 3 : ESI MS/MS spectra of AHLs, by fraction. The entries of this table correspond to the entries in table 2.

Entry	Fraction number	RT (min)	$[M+H]^+$ observed at m/z	Collision energy (eV)	m/z of major fragment ions observed on positive ESI MS/MS spectra (% of relative intensity)
A	M9	3,61	416	12	398 (33) 380 (100) 278 (49) 173 (58) 163 (79) 102 (50)
B	M10	3,87	412	12	394 (100) 376 (27) 260 (2) 102 (40)
D	M11	4,11	380	12	380 (18) 352 (18) 304 (24) 219 (15) 102 (100)
E		4,15	372	12	354 (24) 253 (100) 210 (74) 102 (58)
G	M12	4,39	428	12	428 (23) 410 (49) 392 (80) 309 (100) 290 (42) 102 (17)
H		4,30	398	12	380 (41) 362 (29) 268 (30) 102 (100)
	M13	3,59	416	12	416 (49) 398 (70) 380 (94) 255 (91) 233 (36) 152(51) 102 (100)
J		4,68	400	12	400 (6) 382 (100) 102 (26)
L	M14	4,86	396	12	396 (100) 378 (67) 102 (76) 55 (63)
N	M15	5,16	354	12	354 (12) 336 (7) 102 (73)
M	M16	5,59	414	12	414 (31) 380 (64) 313 (21) 295 (14) 279 (14) 261 (55) 143 (10) 102 (100) 71 (14)
P		5,73	356	12	356 (4) 338 (24) 320 (8) 102 (100)
O		5,84	382	12	382 (21) 364 (12) 179 (21) 102 (100) 56 (12)
R	M17	5,92	338	12	338 (65) 320 (5) 237 (26) 219 (17) 102 (100)
S		6,11	370	12	370 (13) 352 (11) 102 (100)
U	M18	6,30	352	12	352 (49) 334 (14) 251 (62) 233 (16) 123 (17) 102

					(100) 97 (8)
T		6,18	396	12	396 (13) 378 (41) 293 (29) 277 (15) 102 (100)
	MG	6,06	370	12	370 (10) 352 (9) 143 (6) 102 (100)
		5,83	384	12	384 (28) 102 (100)
		6,76	398	12	398 (56) 380 (31) 261 (3) 221 (12) 102 (100)

Molecular formula determination

UHPLC-HRMS analyses were conducted on the active fractions in order to determine the molecular formula of the AHLs detected by LC-MS/MS. UHPLC-HRMS measurements were performed using a Waters Acquity UPLC system coupled to a Waters Micromass LCT Premier time-of-flight mass spectrometer equipped with an electrospray interface (ESI). Column used for this experiment was a Kinetex C18 1.7 μm , 2.1 x 50 mm. Flow rate was 0.6 mL/min. The exact masses and corresponding molecular formulas are reported in **Tableau 3**.

Results & Discussion

Presence and chemical features of AHLs in *Maribius* sp.

Maribius sp. MB culture supernatant was extracted with ethyl acetate and fractionated in 22 microfractions, M1 - M22. These microfractions were tested for AHL production using the biosensor strains *Escherichia coli* MT102 and *Pseudomonas putida* F117. These GFP-base biosensors emit light in presence of AHLs. Interestingly, 11 microfractions were positive in these assays with both biosensors (M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18). Using UHPLC/MS/MS and UHPLC/HRMS, we detected a total of 21 different AHLs in the different microfractions. To our knowledge, this report is the first to reveal such diversity of AHLs produced by a single strain. Others studies on soil bacterial strains revealed 5 AHLs produced by only one strain, like in *Sinorhizobium meliloti* which produces C16-HSL, 3-oxo-C14-HSL, C16:1-HSL, 3-oxo-C16-HSL and 3-oxo-C16:1-HSL (Gao et al. 2005) or *Azospirillum lipoferum* TVV3 which synthesizes C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-OH-C10-HSL, and 3-oxo-C10-HSL (Boyer et al. 2008).

The length of acyl chains in the detected AHLs was in between 15 and 21 carbons (**Tableau 4**). To our knowledge, this report is also the first one to mention the presence of acyl chains longer than 18 carbons. A total of 3 AHLs presented acyl side chains with 19 carbons in microfractions M12 (C₂₃H₄₁NO₆), M14 (C₂₃H₄₁NO₄; Rt HRMS = 2,96 min), M18 (C₂₃H₄₁NO₄; Rt HRMS = 3.37 min) and one had 21 carbons in M16 (C₂₅H₃₅NO₄).

Tableau 4 : AHLs (R-C(O)-HSL) produced by *Maribius sp.* MOLA 401

Entry	Fraction number	Acyl chain length	acyl chain unsaturation	LC/MS Retention time (min)	LC-HRMS Retention time	Experimental m/z [M+H] ⁺	Molecular formula	Calculated m/z [M+H] ⁺	Structure
A	M9	C18	0	3.59	2.14	416.3007	C22H41NO6	416.3012	
B	M10	C18	2	3.66	2.44	412.2714	C22H37NO6	412.2699	
C	M11	C18	1	4.08	2.55	414.2856	C22H39NO6	414.2856	
D	M11	C18	1	4.1	2.6	398.2396	C22H39NO5	398.239	
E	M11	C16	0	4.16	2.65	372.2733	C20H37NO5	372.275	
F	M12	C18	0	4.22	2.65	400.3066	C22H41NO5	400.3063	
G	M12	C19	1	4.36	2.7	428.3015	C23H41NO6	428.3012	
H	M12	C18	1	4.42	2.78	398.2908	C22H39NO5	398.2906	
I	M13	C17	0	4.49	2.8	386.2917	C21H39NO5	386.2906	
J	M13	C18	0	4.61	2.85	400.3066	C22H41NO5	400.3063	
K	M13	C18	0	4.7	2.93	400.3065	C22H41NO5	400.3063	
L	M14	C19	1	4.77	2.96	396.3107	C23H41NO4	396.3114	
M	M16	C21	6	5.02	3.09	414.2664	C25H35NO4	414.2644	
N	M15	C16	1	5.14	3.1	354.2634	C20H35NO4	354.2644	
O	M15	C15	0	5.38	3.14	342.1692	C19H35NO4	342.1705	
P	M16	C16	0	5.49	3.14	356.2800	C20H37NO4	356.2801	
Q	M16	C18	1	5.62	3.21	382.2950	C22H39NO4	382.2957	
R	M17	C16	1	5.71	3.25	338.2687	C20H35NO3	338.2687	
S	M17 / M18	C17	0	5.79	3.31	370.2946	C21H39NO4	370.2957	
T	M18	C19	1	5.93	3.37	396.3091	C23H41NO4	396.3108	
U	M18	C17	1	5.8	3.4	352.2849	C21H37NO3	352.2852	

We also detected 11 AHLs with 2 or 3 hydroxyl groups along the acyl side chain. An examination of previously characterized AHLs revealed a maximum of 1 hydroxylation per acyl chain (Churchill & Chen 2011). Thus, we report here an interesting new feature of marine AHLs, with multihydroxylations of the acyl chain. AHLs in microfractions M11 (C₂₂H₃₉NO₅, C₂₀H₃₇NO₅), M12 (C₂₂H₄₁NO₅, C₂₂H₃₉NO₅), M13 (C₂₁H₃₉NO₅), M13 (C₂₂H₄₁NO₅ Rt HRMS = 2.85 min) and M13 (C₂₂H₄₁NO₅ Rt HRMS = 2.93 min) have 2 hydroxyl group in their acyl side chain, and some AHLs in fractions M9 (C₂₂H₄₁NO₆), M10 (C₂₂H₃₇NO₆), M11 (C₂₂H₃₉NO₆) and M12 (C₂₃H₄₁NO₆) comprise 3 hydroxyl groups in their acyl side chain. The others AHLs produced by *Maribius* sp MOLA 401 have more common acyl chain (**Tableau 4**).

Also, 12 from the 21 AHLs detected had one or two unsaturation(s) in their acyl side chain (Table 2). The following AHLs are concerned: C₂₂H₃₇NO₆ (in M10 microfraction), C₂₂H₃₉NO₆ and C₂₂H₃₉NO₅ (in M11), C₂₃H₄₁NO₆ and C₂₂H₃₉NO₅ (in M12), C₂₃H₄₁NO₄ (in M14), C₂₅H₃₅NO₄ (in M16), C₂₀H₃₅NO₄ (in M15), C₂₂H₃₉NO₄ (in M16), C₂₀H₃₅NO₃ (in M17), C₂₃H₄₁NO₄ and C₂₁H₃₇NO₃ (in M18) (Table 2). When oxygens and unsaturations are detected in the side chain, it was not possible to conclude on the presence of a carbonyl group or a hydroxyl and a carbon-carbon double bond, as the two possibilities would lead to the same molecular formula.

The features of the acyl chain determine the hydrophilic properties of AHLs, as short chain molecules are more polar than those presenting long aliphatic chains. However, it appears that marine bacteria produce AHLs with long chains (Wagner-Döbler et al. 2005, Zan et al. 2012). Our data confirm these previous observations. AHLs with long acyl side chains are presumably more stable in basic environment like marine water (pH = 8.2) (Wagner-Döbler et al. 2005, Zan et al. 2012). It could be assessed that the long saturated chain are only slightly soluble in marine environment (Yates et al. 2002). However, most of the *Maribius*

AHLs oxidized. Collectively, these data indicate that *Maribius* AHLs are highly adapted for quorum sensing in marine environments, with acyl side chain modifications decreasing AHL hydrophobicity, increasing water solubility, and increasing compatibility with active efflux pumps (Pearson et al. 1999). These structural features favour diffusion in sea water where AHLs achieve their ecological function.

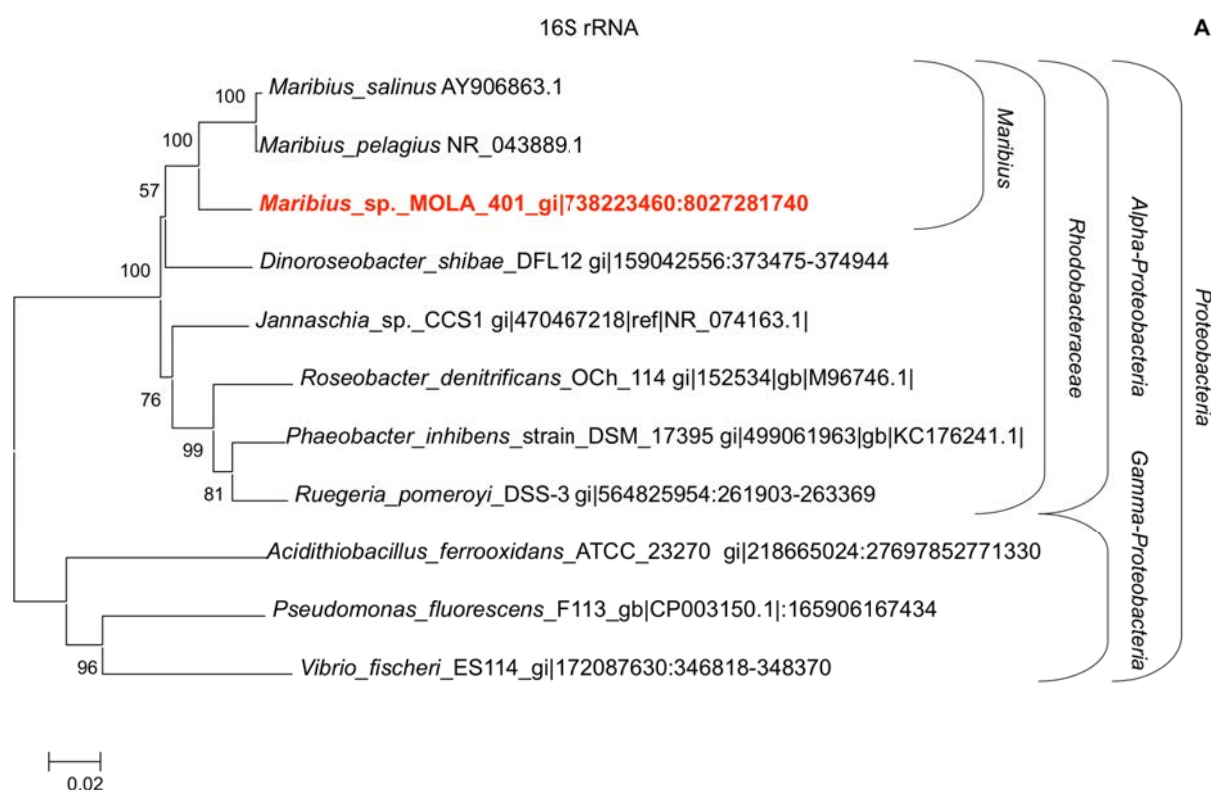
Most of *Roseobacter* bacteria produce long chain AHLs with additional modifications (Cude & Buchan 2013). For example, the marine free-living strain *Rhodobacter sphaeroides* produces C14:1-HSL (Puskas et al. 1997), the marine dinoflagellate associated bacteria *Dinoroseobacter shibae* synthesizes C18:1-HSL, C16-HSL, C15-HSL and C14-HSL (Patzelt et al. 2013), the sponge symbiont *Ruegeria* sp. emits OH-C14-HSL, OH-C14:1-HSL and OH-C12-HSL (Zan et al. 2012). *Silicibacter pomeroyi* produces the *p*-coumaroyl-HSL, a non-conventional AHL in which the acyl side chain is replaced by a coumaroyl moiety (Schaefer et al. 2008). Nevertheless, the hyper-hydroxylation of acyl chain observed in *Maribius* combined with the presence of unsaturation appears to be an original feature. We hypothesize that the AHL synthase produces a molecule with acyl chain containing 15 to 21 carbons, and that additional modifications of the acyl chain occur with cytochrome P450 (Chowdhary et al. 2007) (WP_036181863.1), which oxidizes aliphatic chains, and with desaturases which produce double bonds (Aguilar & De Mendoza 2006). Interestingly, we detected genes encoding for these enzymes in the genome of *Maribius* sp. MOLA401 (Doberva et al. 2014), supporting our hypothesis.

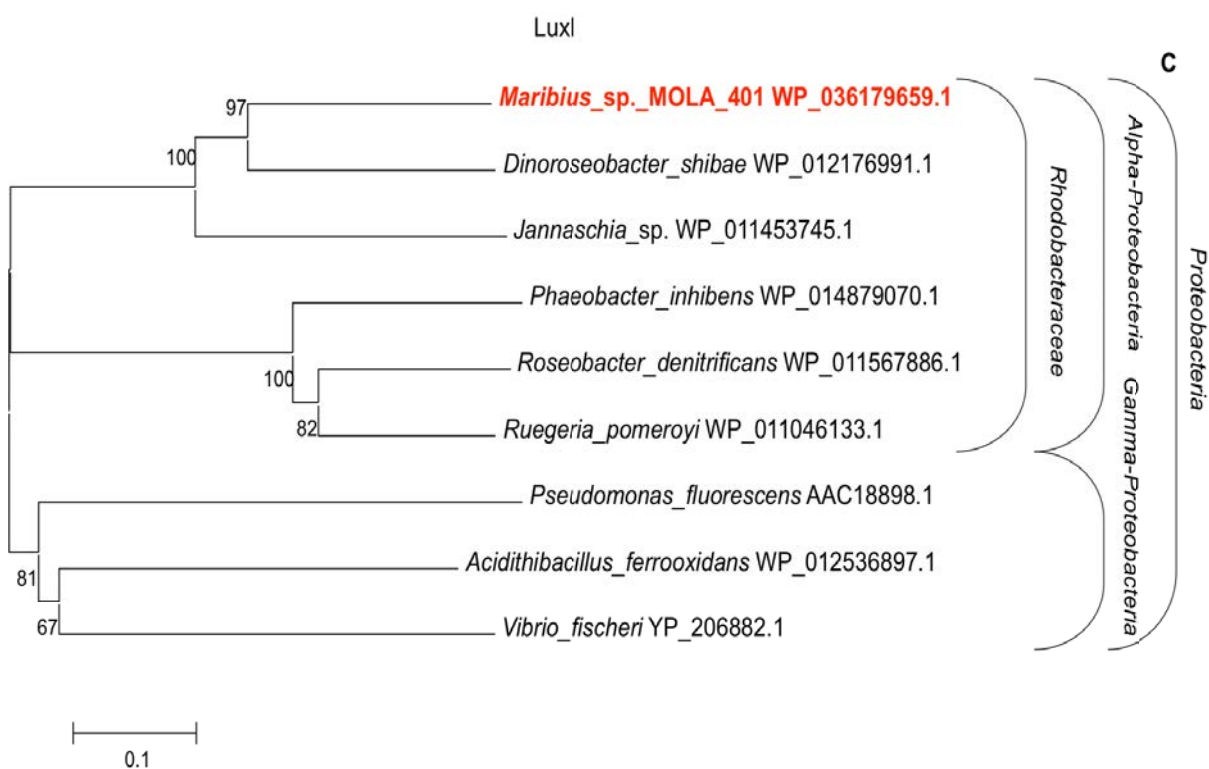
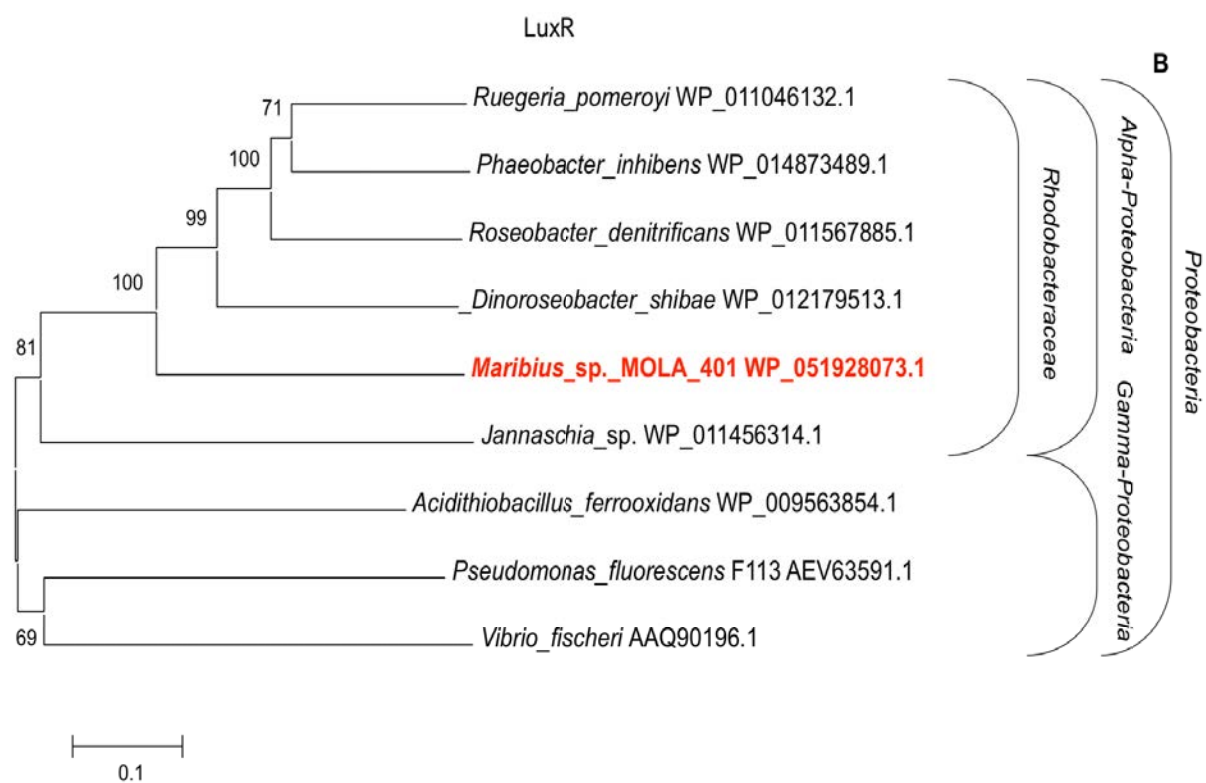
Another interesting *Maribius* AHLs pattern is the intriguing acyl chain variability with 15 to C carbons. Analog pattern has been previously observed in the moderate halophilic strain *Halomonas*, which produces C12-HSL, C8-HSL, C6-HSL, and C4-HSL (Llamas et al. 2005). This pattern has also been observed in *Acidithiobacillus ferrooxydans* isolated from mine drainage. In this prokaryote, the characterized AHLs bear C16-, C12-, C10-, C8- long

acyl chains (Farah et al. 2005, Wenbin et al. 2011). Interestingly, additional hydroxylations of these chains were also observed. *Acidithiobacillus ferrooxydans* emits both OXO-C12-HSL and OH-C12-HSL (Farah et al. 2005, Wenbin et al. 2011). These works and our suggest that in many cases the same LuxI-synthase may produce several AHLs with low side chain specificity.

Linking genetic and chemical features

The phylogenetic tree based on 16SrRNA sequences confirms the position of *Maribius* MOLA 401 among the *Rhodobacteraceae* family and the *Proteobacteria* phylum (**Figure 30A**). The position of this strain, closely related to two other main members of *Maribius* genus previously isolated, is supported by a strong bootstrap (BP_{NJ}=100) (**Figure 30A**) and confirms phylogenetic affiliation to the *Roseobacter* clade.





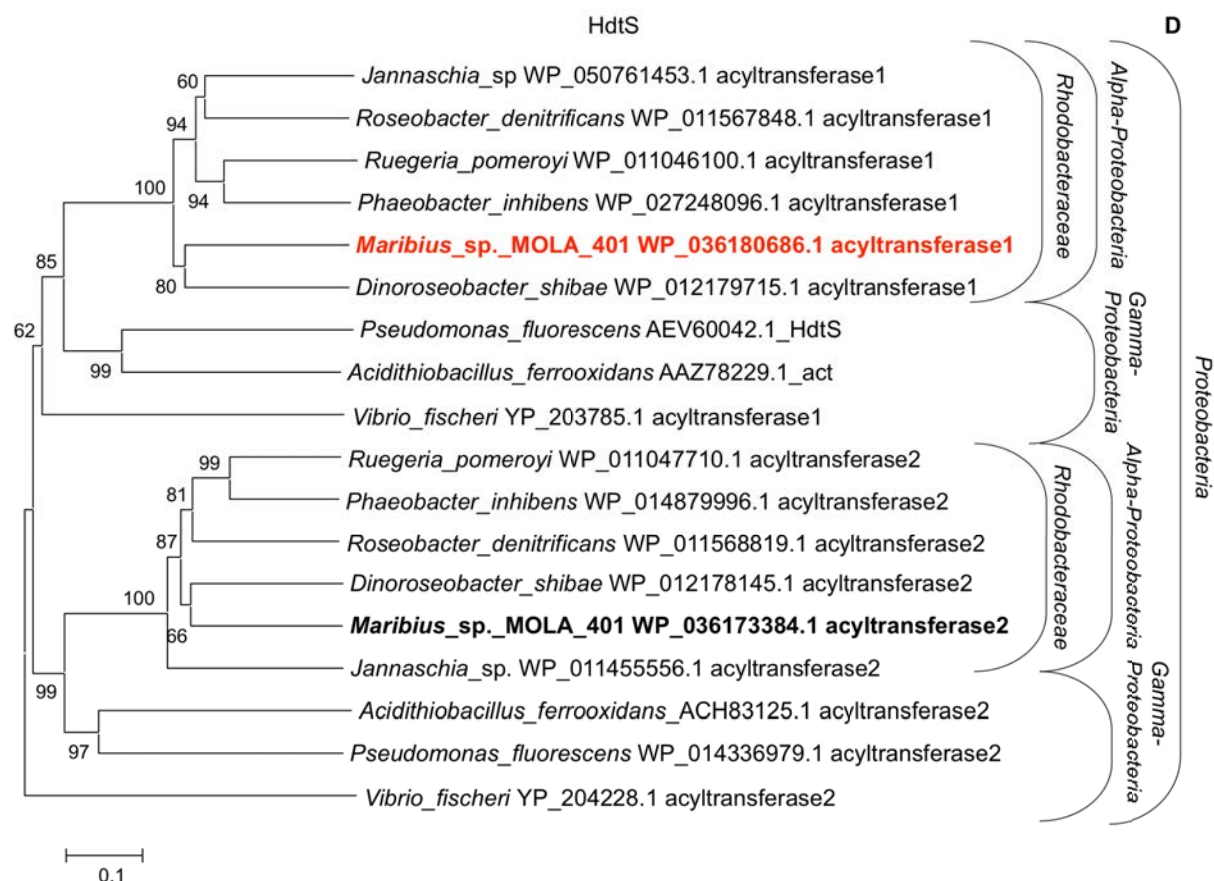


Figure 30 : Neighbour-Joining phylogenetic trees from *Maribius* sp. MOLA 401 sequences. NJ trees constructed with p-distance correction and 500 bootstrap replicates from: A) the 16S RNA gene traditional phylogenetic marker; B) the protein sequences of luxR, the receptor of AHLs; C) the protein sequences of luxI, the key enzyme of AHLs biosynthesis pathway; and D) the protein sequences of hdtS an other key enzyme (from the acyltransferase family) of AHLs biosynthesis pathway among the three known.

The *Maribius* MOLA 401 LuxI protein sequence is closely related to other LuxI sequences of *Rhodobacteraceae* strains within *Alpha-proteobacteria* (**Figure 30C**). Interestingly, each group of *Rhodobacteraceae* LuxI sequences (group 1 includes *Ruegeria pomeroyi*, *Roseobacter denitrificans*, *Phaeobacter inhibens*; group 2 includes *Dinoroseobacter shibae*, *Maribius* sp., *Jannaschia* sp.) is supported by a bootstrap of 100

(**Figure 30C**). Similarly, the phylogenetic tree based on luxR protein sequences (AHL receptor) reveals that *Maribius* MOLA 401 luxR orthologue sequence belongs to the *Rhodobacteraceae* family within the *Alpha-proteobacteria* phylum, assertion also supported with a bootstrap support of 81 (**Figure 30B**). These data clearly indicate that *Maribius* sp. MOLA401 strain presents all the genomic features of the *Roseobacter* group when considering either its 16SrRNA taxonomic marker, or the genes encoding for AHL production. Such genomic characters give strong support to make *Maribius* sp. MOLA 401 a model strain for future studies of quorum sensing in marine environments.

Another protein potentially involved in AHL production is HdtS, detected in the full genome sequence of *Maribius* sp. MOLA 401 (Doberva et al. 2014). HdtS is a member of the lysophosphatidic acid acyltransferase family (Laue et al. 2000) and harbors a dual functionality: acylation of lysophosphatidic acid (Cullinane et al. 2005) and AHL synthesis (Laue et al. 2000). The production of AHL based on HdtS has been demonstrated experimentally in *Pseudomonas fluorescens* (Laue et al. 2000) and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Rivas et al. 2007). The *Maribius* sp. MOLA 401 HdtS sequences are related with those found in *Rhodobacteraceae* (**Figure 30D**). Two groups of HdtS sequences are observed, and all *Maribius* sequences are clustered with others found in *Rhodobacteraceae*, with strong bootstrap supports of 100. Interestingly, *Maribius* sp. MOLA 401 HdtS sequences present close relationships with those detected in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Pseudomonas fluorescens*, the only two *Gamma-proteobacteria* which were functionally tested for AHLs synthesis (acyltransferase1 sequences, **Figure 30D**). Such observation highly suggests an active participation of HdtS to the synthesis of the AHL pool produced by *Maribius*, in cooperation with LuxI.

The specificity of LuxI synthases varies, especially in regards to the type of acyl side chain recognized as substrate (Gould et al. 2004). For example, the LasI (a LuxI homolog) in

Pseudomonas aeruginosa produces different AHLs depending on the growth conditions and the host. By contrast, YspI and EsaI respectively found in *Yersinia pestis* and *Erwinia stewartii* are specific to one type of acyl-ACP (Gould et al. 2006) producing defined AHLs. *Maribius* sp. MOLA401 LuxI synthase harbors conserved arginine and phenylalanine in the positions 23 and 27 (two key aminoacids in this protein) respectively. This pattern is very similar to the one described in *Pseudomonas aeruginosa*. Thus, the sequence features of *Maribius* LuxI account for the very large number of emitted AHLs.

Ecology of *Maribius* sp. MOLA401

Maribius sp. MOLA 401 is a free-living pelagic oligotroph bacteria from the *Roseobacter* clade. As mentioned before, it was isolated in a Pacific ocean lagoon. The ability of an oligotrophic bacteria to communicate could appear paradoxal (Moran et al. 2004) as cell densities in such environments are below the expected threshold that enables quorum sensing. However, our study demonstrates the synthesis by *Maribius* sp. MOLA401 of long and hyper-hydroxylated AHLs. Many marine bacteria alternate between free-living and particle-attached lifestyles (Grossart et al. 2007, Ghiglione et al. 2007, Crespo et al. 2013). In the latest condition, frequently assimilated to a biofilm way of life, bacteria are generally concentrated enough to perform quorum sensing communication. Interestingly, *Maribius* MOLA 401 can form biofilm. Thus, the large spectrum of AHL produced by *Maribius* MOLA 401 might give this strain the ability to exploit organic matter by coordination of the bacterial population when attached.

Conclusions

Collectively, our data reveal that *Maribius* sp. MOLA401 is an oligotrophic strain able to communicate by quorum sensing with a large number of AHLs. These molecules present interesting and original features compared to those previously published, and provide new insights into adaptation of quorum sensing to marine environments.

Aknowledgements

We thank Sarah Benai, Laurent Intertaglia and Yoan Ferandin for technical help. We thank Fabien Joux for providing strain *Maribius* sp MOLA 401. We thank Prof. Irene Wagner-Döbler for providing biosensors strains *Pseudomonas putida* F117 and *Escherichia coli* MT102. This work was supported by an Emergence UPMC grant and a CNRS-EC2CO grant.

Bibliography

Aguilar PS, De Mendoza D (2006) Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Mol Microbiol* 62:1507–1514

Amin SA, Hmelo LR, Tol HM van, Durham BP, Carlson LT, Heal KR, Morales RL, Berthiaume CT, Parker MS, Djunaedi B, Ingalls AE, Parsek MR, Moran MA, Armbrust EV (2015) Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature* 522:98–101

Andersen JB, Heydorn A, Hentzer M, Eberl L, Geisenberger O, Christensen BB, Molin S, Givskov M (2001) gfp-Based N-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Appl Environ Microbiol* 67:575–585

Atkinson S, Williams P (2009) Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* 6:959–978

Bassler BL (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2:582–587

Bassler BL (2002) Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell* 109:421–424

Berger M, Neumann A, Schulz S, Simon M, Brinkhoff T (2011) Tropodithietic Acid Production in *Phaeobacter gallaeciensis* Is Regulated by N-Acyl Homoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing. *J Bacteriol* 193:6576–6585

Boyer M, Bally R, Perrotto S, Chaintreuil C, Wisniewski-Dyé F (2008) A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*. *Res Microbiol* 159:699–708

Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S (2008) AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* 2:345–349

Cha C, Gao P, Chen Y-C, Shaw PD, Farrand SK (1998) Production of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by Gram-Negative Plant-Associated Bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11:1119–1129

Choi DH, Cho J-C, Lanoil BD, Giovannoni SJ, Cho BC (2007) *Maribius salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a solar saltern and *Maribius pelagius* sp. nov., cultured from the Sargasso Sea, belonging to the Roseobacter clade. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:270–275

Chowdhary PK, Keshavan N, Nguyen HQ, Peterson JA, González JE, Haines DC (2007) *Bacillus megaterium* CYP102A1 Oxidation of Acyl Homoserine Lactones and Acyl Homoserines†. *Biochemistry (Mosc)* 46:14429–14437

Churchill MEA, Chen L (2011) Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling. *Chem Rev* 111:68–85

Conan P, Joux F, Torrtton J, PujoPay M, Douki T, RochelleNewall E, Mari X (2008) Effect of solar ultraviolet radiation on bacterio- and phytoplankton activity in a large coral reef lagoon (southwest New Caledonia). *Aquat Microb Ecol* 52:83–98

- Crespo BG, Pommier T, Fernández-Gómez B, Pedrós-Alió C (2013) Taxonomic composition of the particle-attached and free-living bacterial assemblages in the Northwest Mediterranean Sea analyzed by pyrosequencing of the 16S rRNA. *MicrobiologyOpen* 2:541–552
- Cude WN, Buchan A (2013) Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing in the Roseobacter clade: complex cell-to-cell communication controls multiple physiologies. *Front Microbiol* 4
- Cullinane M, Baysse C, Morrissey JP, O’Gara F (2005) Identification of two lysophosphatidic acid acyltransferase genes with overlapping function in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151:3071–3080
- Dickschat JS (2010) Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* 27:343–369
- Diggle SP, Crusz SA, Cámara M (2007) Quorum sensing. *Curr Biol CB* 17:R907–910
- Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Joux F, Lebaron P, Lami R (2014) Genome Sequence of *Maribius* sp. Strain MOLA 401, a Marine Roseobacter with a Quorum-Sensing Cell-Dependent Physiology. *Genome Announc* 2:e00997–14
- Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Toulza E, Lebaron P, Lami R (2015) Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling metagenomic database. *Aquat Microb Ecol* 74:107–119
- Engbrecht J, Silverman M (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci* 81:4154–4158
- Farah C, Vera M, Morin D, Haras D, Jerez CA, Guiliani N (2005) Evidence for a Functional Quorum-Sensing Type AI-1 System in the Extremophilic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 71:7033–7040
- Fuqua C, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:685–695
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176:269–275
- Gao M, Chen H, Eberhard A, Gronquist MR, Robinson JB, Rolfe BG, Bauer WD (2005) *sinI*- and *expR*-Dependent Quorum Sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 187:7931–7944
- Gelencsér Z, Choudhary KS, Coutinho BG, Hudaiberdiev S, Galbáts B, Venturi V, Pongor S (2012) Classifying the Topology of AHL-Driven Quorum Sensing Circuits in Proteobacterial Genomes. *Sensors* 12:5432–5444
- Ghiglione JF, Mevel G, Pujo-Pay M, Mousseau L, Lebaron P, Goutx M (2007) Diel and Seasonal Variations in Abundance, Activity, and Community Structure of Particle-Attached and Free-Living Bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 54:217–231
- Gilson L, Kuo A, Dunlap PV (1995) *AinS* and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* 177:6946–6951
- Gould TA, Herman J, Krank J, Murphy RC, Churchill MEA (2006) Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Synthases Examined by Mass Spectrometry. *J Bacteriol* 188:773–783
- Gould TA, Schweizer HP, Churchill MEA (2004) Structure of the *Pseudomonas aeruginosa*

acyl-homoserinelactone synthase LasI. *Mol Microbiol* 53:1135–1146

Gram L, Grossart H-P, Schlingloff A, Kjørboe T (2002) Possible Quorum Sensing in Marine Snow Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by Roseobacter Strains Isolated from Marine Snow. *Appl Environ Microbiol* 68:4111–4116

Grossart H-P, Tang KW, Kjørboe T, Ploug H (2007) Comparison of cell-specific activity between free-living and attached bacteria using isolates and natural assemblages. *FEMS Microbiol Lett* 266:194–200

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948

Laue BE, Jiang Y, Chhabra SR, Jacob S, Stewart GSAB, Hardman A, Downie JA, O’Gara F, Williams P (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146:2469–2480

Limardo AJ, Worden AZ (2015) Microbiology: Exclusive networks in the sea. *Nature* 522:36–37

Llamas I, Quesada E, Martínez-Cánovas MJ, Gronquist M, Eberhard A, González JE (2005) Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. *Extrem Life Extreme Cond* 9:333–341

Loh J, Pierson EA, Pierson III LS, Stacey G, Chatterjee A (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 5:285–290

Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165–199

Mohamed NM, Cicirelli EM, Kan J, Chen F, Fuqua C, Hill RT (2008) Diversity and quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. *Environ Microbiol* 10:75–86

Moran MA, Buchan A, González JM, Heidelberg JF, Whitman WB, Kiene RP, Henriksen JR, King GM, Belas R, Fuqua C, Brinkac L, Lewis M, Johri S, Weaver B, Pai G, Eisen JA, Rahe E, Sheldon WM, Ye W, Miller TR, Carlton J, Rasko DA, Paulsen IT, Ren Q, Daugherty SC, Deboy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Nelson WC, Sullivan SA, Rosovitz MJ, Haft DH, Selengut J, Ward N (2004) Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature* 432:910–913

Nealson KH (1977) Autoinduction of bacterial luciferase. *Arch Microbiol* 112:73–79

Parsek MR, Greenberg EP (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 13:27–33

Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4360–4365

Patzelt D, Wang H, Buchholz I, Rohde M, Gröbe L, Pradella S, Neumann A, Schulz S, Heyber S, Münch K, Münch R, Jahn D, Wagner-Döbler I, Tomasch J (2013) You are what you talk: quorum sensing induces individual morphologies and cell division modes in *Dinoroseobacter shibae*. *ISME J* 7:2274–2286

- Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH (1999) Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *J Bacteriol* 181:1203–1210
- Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, Schaefer AL (1997) A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 179:7530–7537
- Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Høiby N, Givskov M, Molin S, Eberl L (2001) N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147:3249–3262
- Rivas M, Seeger M, Jedlicki E, Holmes DS (2007) Second Acyl Homoserine Lactone Production System in the Extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 73:3225–3231
- Schaefer AL, Greenberg EP, Oliver CM, Oda Y, Huang JJ, Bittan-Banin G, Peres CM, Schmidt S, Juhaszova K, Sufrin JR, Harwood CS (2008) A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* 454:595–599
- Schaefer AL, Taylor TA, Beatty JT, Greenberg EP (2002) Long-Chain Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Regulation of *Rhodobacter capsulatus* Gene Transfer Agent Production. *J Bacteriol* 184:6515–6521
- Smith RS, Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6:56–60
- Steindler L, Venturi V (2007) Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* 266:1–9
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Thiel V, Kunze B, Verma P, Wagner-Döbler I, Schulz S (2009) New Structural Variants of Homoserine Lactones in Bacteria. *ChemBioChem* 10:1861–1868
- Wagner-Döbler I, Biebl H (2006) Environmental Biology of the Marine *Roseobacter* Lineage. *Annu Rev Microbiol* 60:255–280
- Wagner-Döbler I, Thiel V, Eberl L, Allgaier M, Bodor A, Meyer S, Ebner S, Hennig A, Pukall R, Schulz S (2005) Discovery of Complex Mixtures of Novel Long-Chain Quorum Sensing Signals in Free-Living and Host-Associated Marine Alphaproteobacteria. *ChemBioChem* 6:2195–2206
- Waters CM, Bassler BL (2005) QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319–346
- Wenbin N, Dejuan Z, Feifan L, Lei Y, Peng C, Xiaoxuan Y, Hongyu L (2011) Quorum-sensing system in *Acidithiobacillus ferrooxidans* involved in its resistance to Cu²⁺. *Lett Appl Microbiol* 53:84–91
- Withers H, Swift S, Williams P (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:186–193
- Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, Goldner M, Dessaux

Y, Cámara M, Smith H, Williams P (2002) N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 70:5635–5646

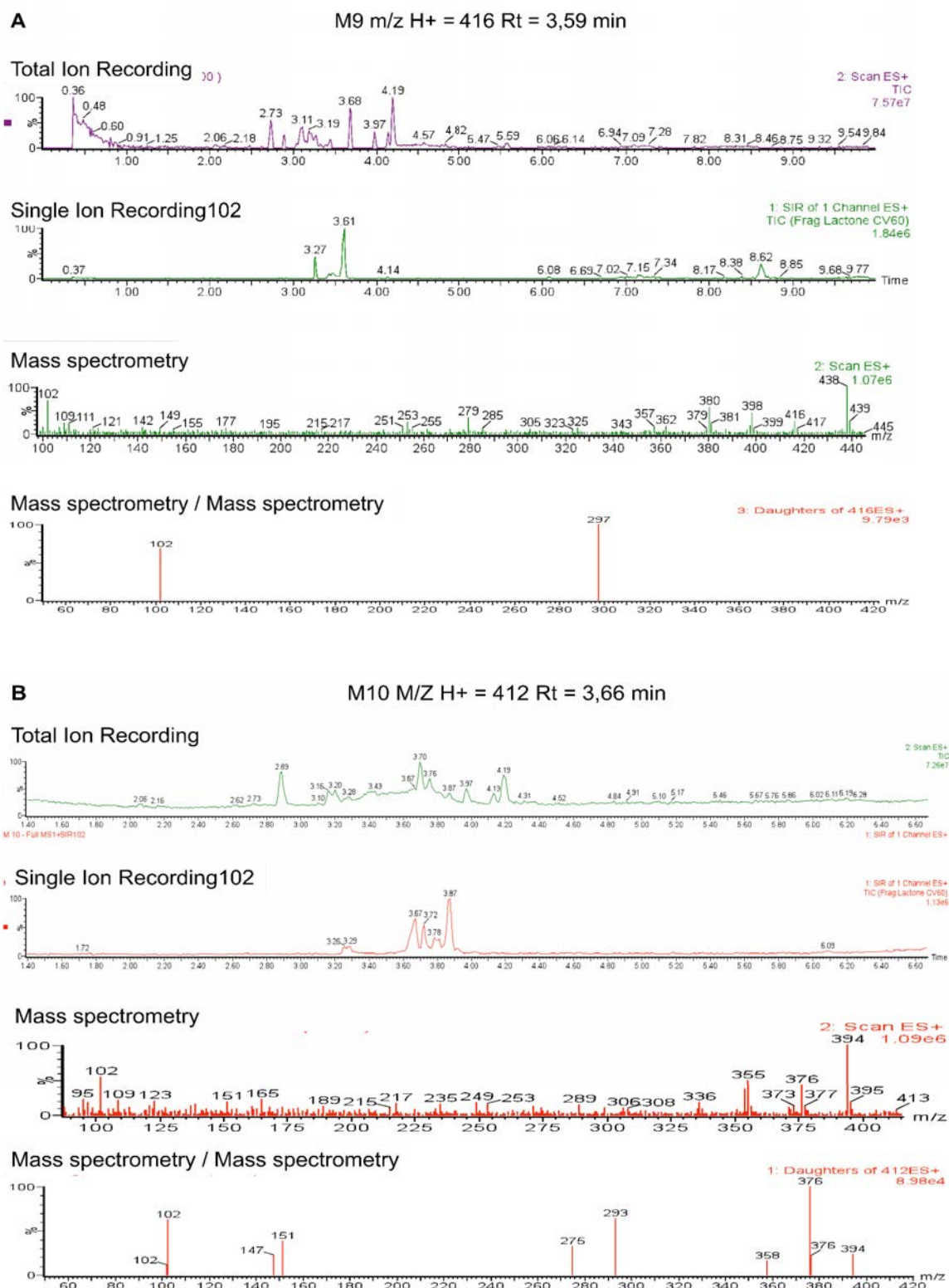
Zan J, Choi O, Meharena H, Uhlson CL, Churchill MEA, Hill RT, Fuqua C (2015) A solo luxI-type gene directs acylhomoserine lactone synthesis and contributes to motility control in the marine sponge symbiont *Ruegeria* sp. KLH11. *Microbiology* 161:50–56

Zan J, Cicirelli EM, Mohamed NM, Sibhatu H, Kroll S, Choi O, Uhlson CL, Wysoczinski CL, Murphy RC, Churchill MEA, Hill RT, Fuqua C (2012) A Complex LuxR-LuxI Type Quorum Sensing Network in a Roseobacterial Marine Sponge Symbiont Activates Flagellar Motility and Inhibits Biofilm Formation. *Mol Microbiol* 85:916–933

Zan J, Liu Y, Fuqua C, Hill RT (2014) Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing in the Roseobacter Clade. *Int J Mol Sci* 15:654–669

Supplementary Figure : chromatograms of fractions M1-M22 and AHLs

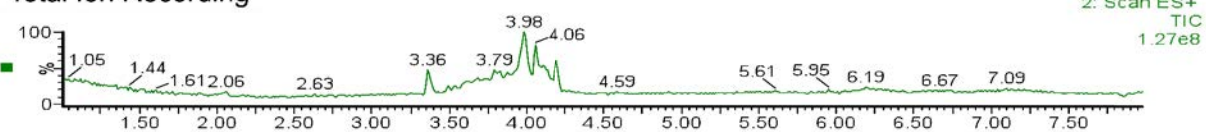
MS/MS spectra (from A to U)



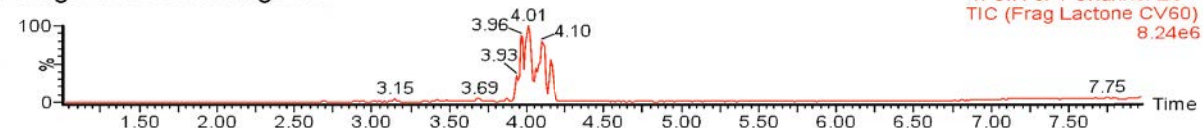
C

M11 M/Z H+ = 414 Rt = 4,08 min

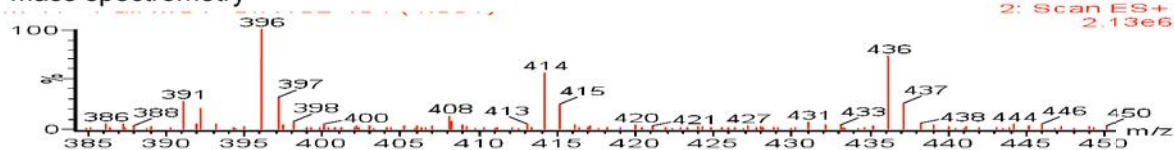
Total Ion Recording



Single Ion Recording102



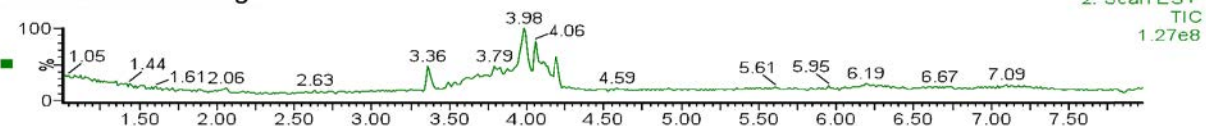
Mass spectrometry



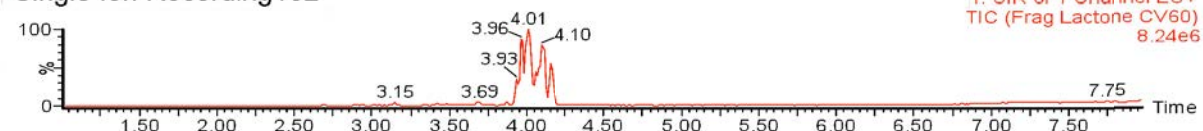
D

M11 M/Z H+ = 398 Rt = 4,10 min

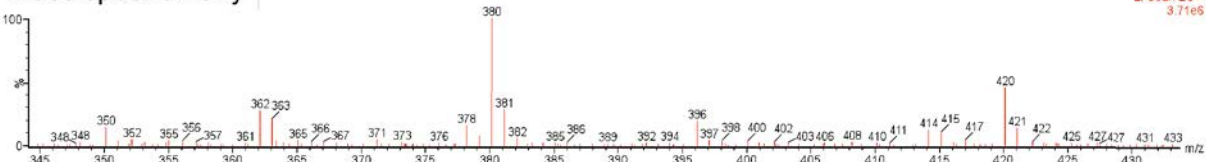
Total Ion Recording



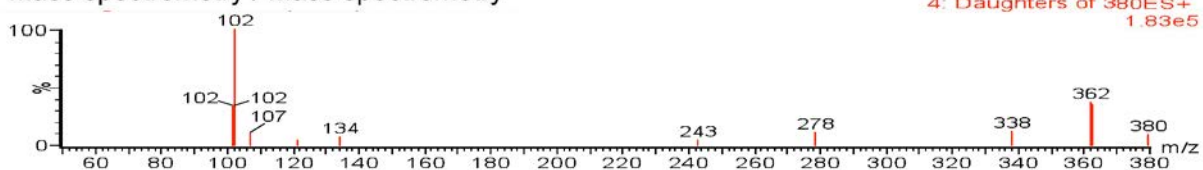
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



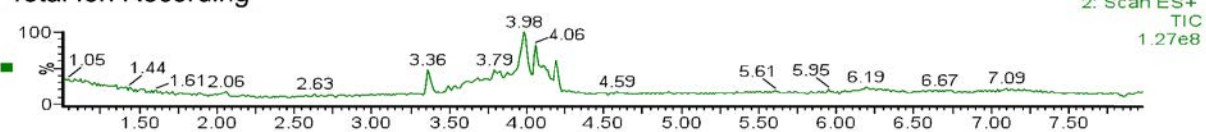
Mass spectrometry / Mass spectrometry



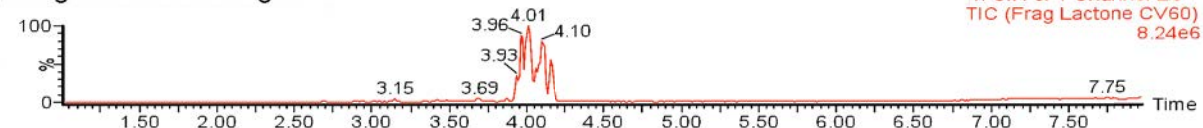
E

M11 M/Z H⁺ = 372 Rt = 4,16 min

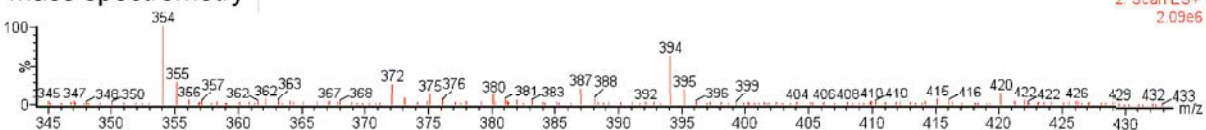
Total Ion Recording



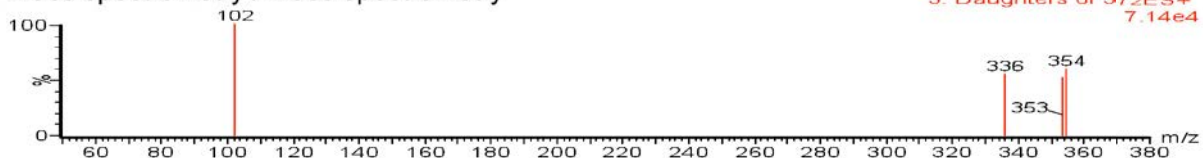
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



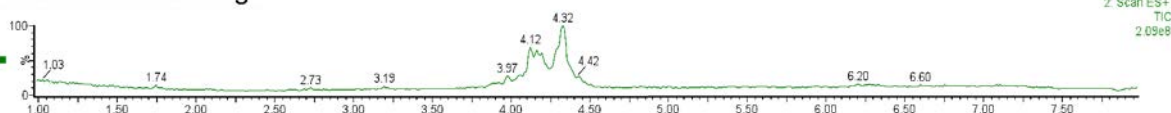
Mass spectrometry / Mass spectrometry



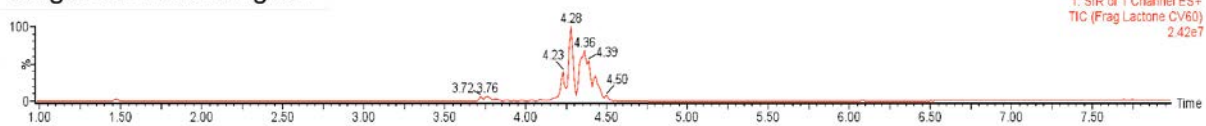
F

M12 M/Z H⁺ = 400 Rt = 4,22 min

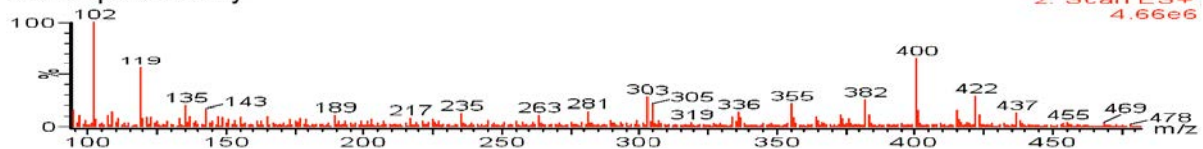
Total Ion Recording



Single Ion Recording102



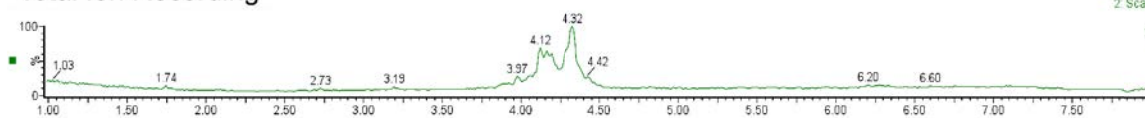
Mass spectrometry



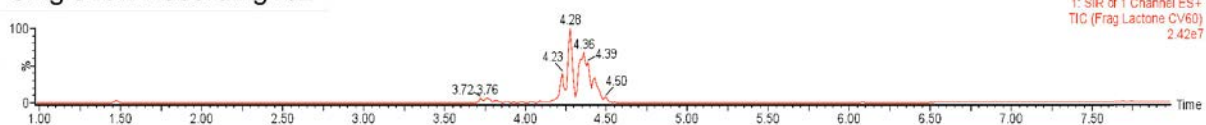
G

M12 M/Z H+ = 428 Rt = 4,36 min

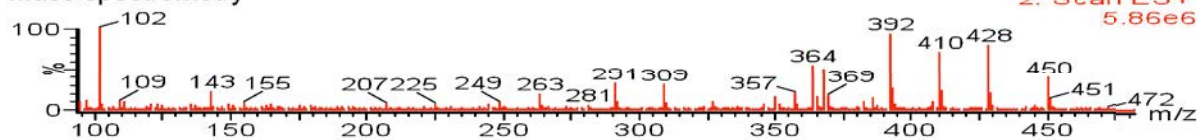
Total Ion Recording



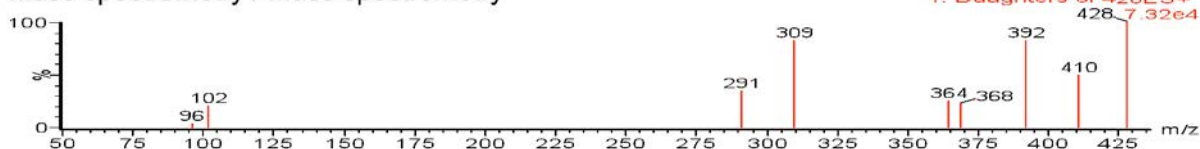
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



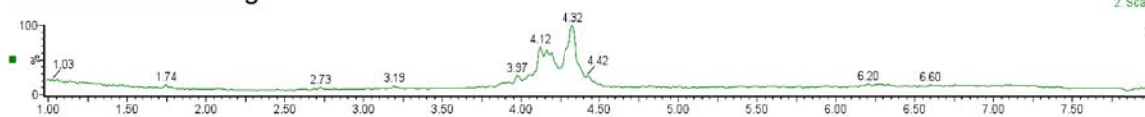
Mass spectrometry / Mass spectrometry



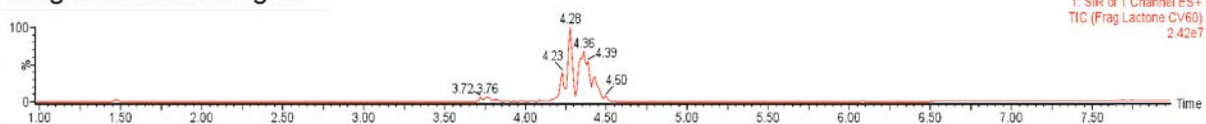
H

M12 M/Z H+ = 398 Rt = 4,42 min

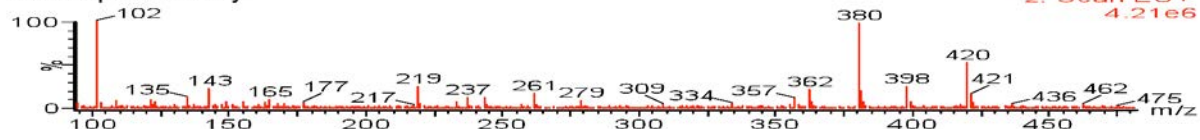
Total Ion Recording



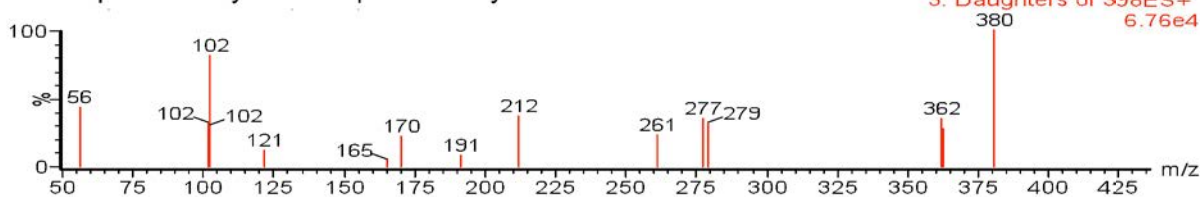
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



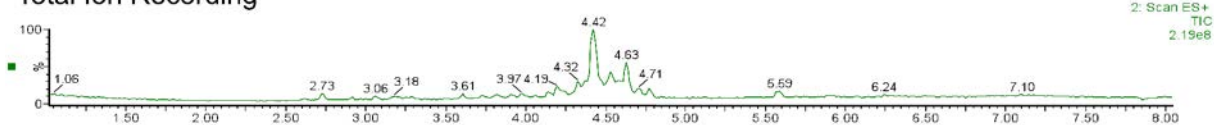
Mass spectrometry / Mass spectrometry



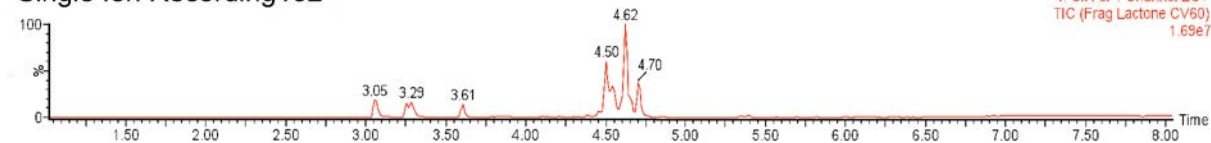
I

M13 M/Z H⁺ = 386 Rt = 4,49 min

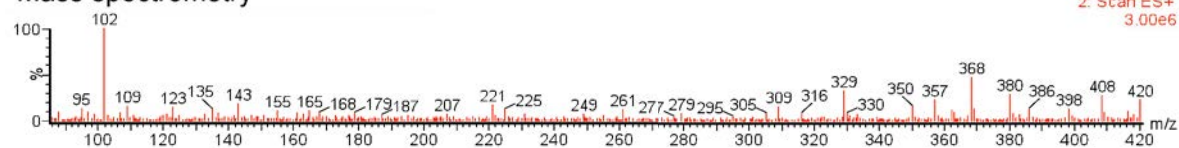
Total Ion Recording



Single Ion Recording102



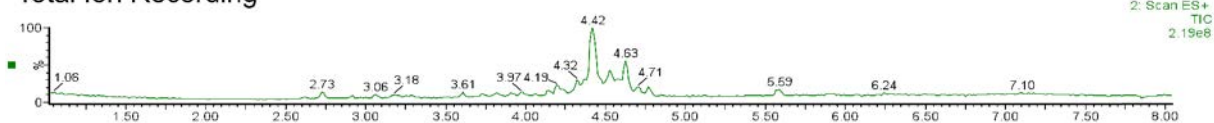
Mass spectrometry



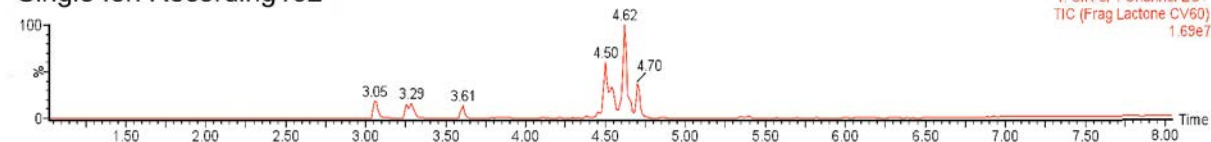
J

M13 M/Z H⁺ = 400 Rt = 4,61 min

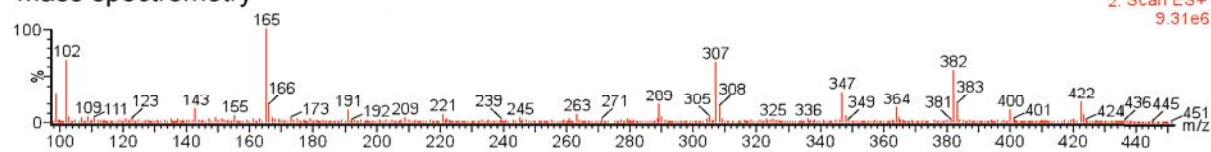
Total Ion Recording



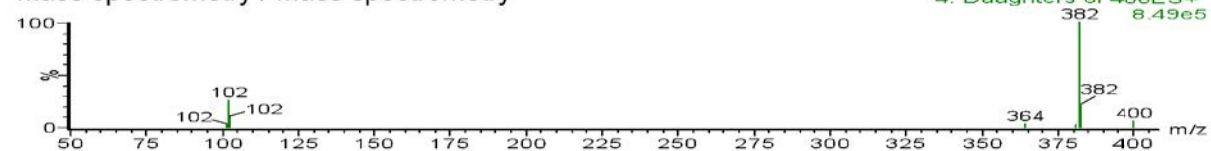
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



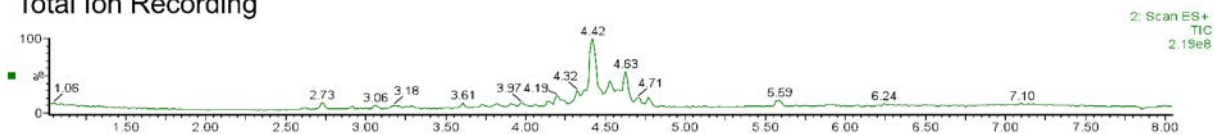
Mass spectrometry / Mass spectrometry



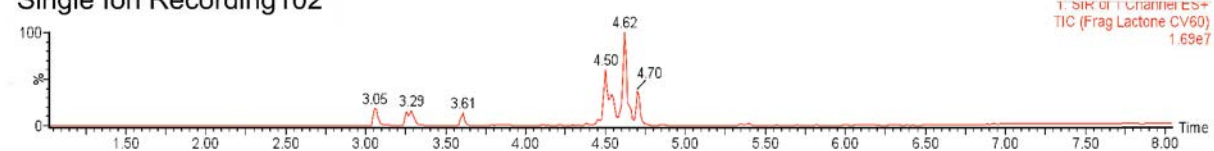
K

M13 M/Z H+ = 400 Rt = 4,70 min

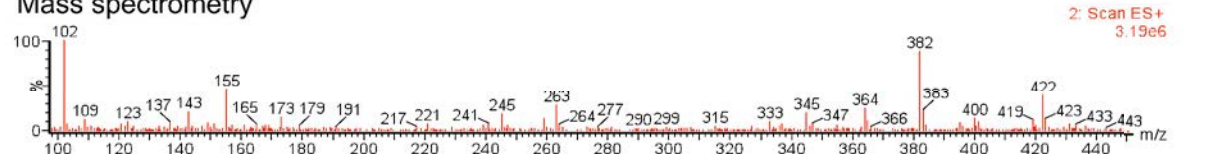
Total Ion Recording



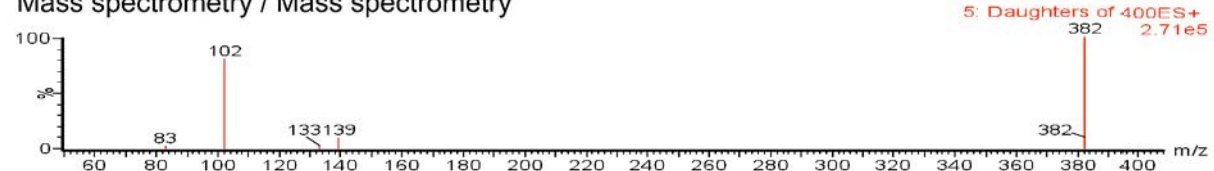
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



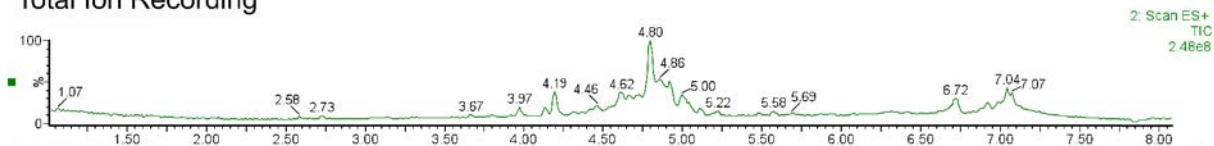
Mass spectrometry / Mass spectrometry



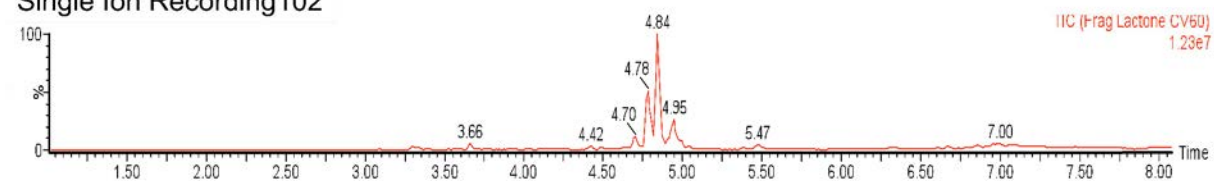
L

M14 M/Z H+ = 396 Rt = 4,77 min

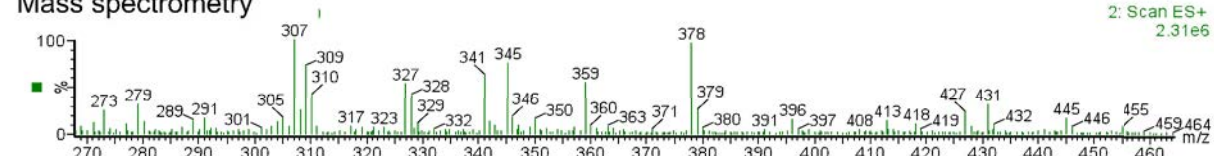
Total Ion Recording



Single Ion Recording102



Mass spectrometry



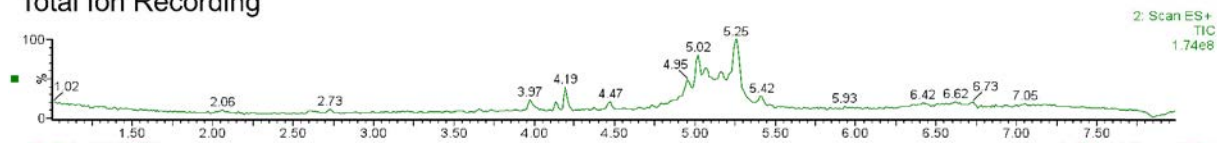
Mass spectrometry / Mass spectrometry



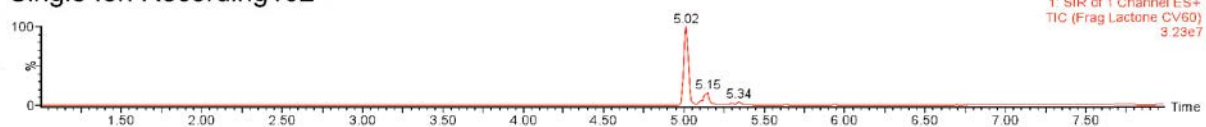
M

M15 M/Z H+ = 354 Rt = 5,02 min

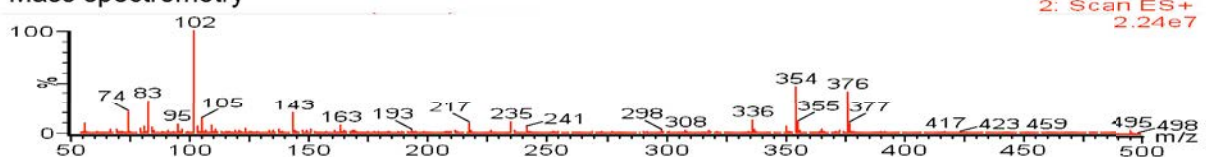
Total Ion Recording



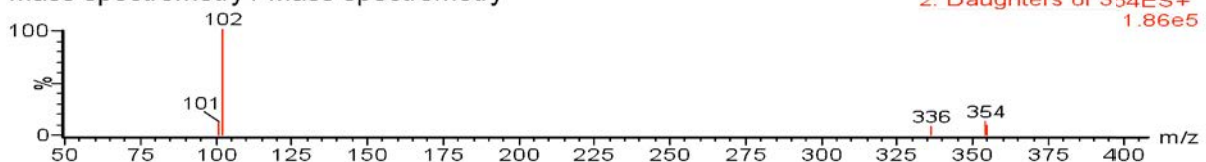
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



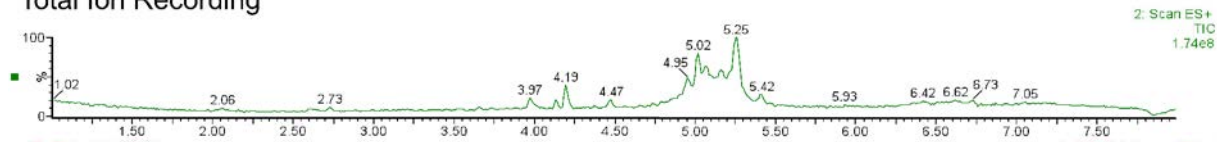
Mass spectrometry / Mass spectrometry



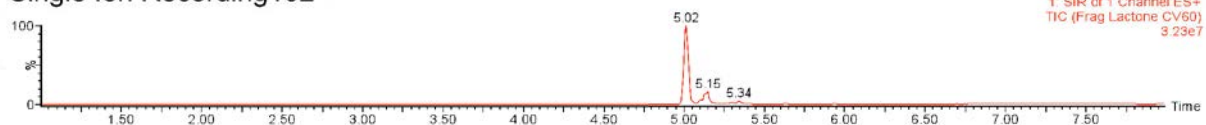
N

M15 M/Z H+ = 342 Rt = 5,14 min

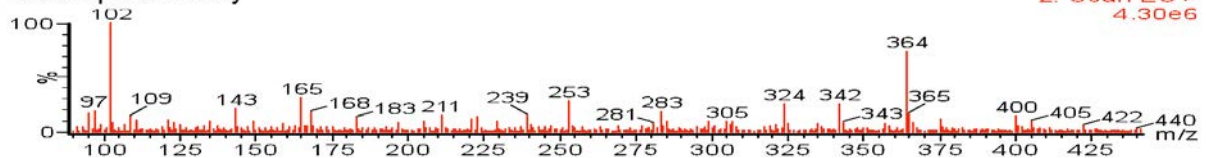
Total Ion Recording



Single Ion Recording102



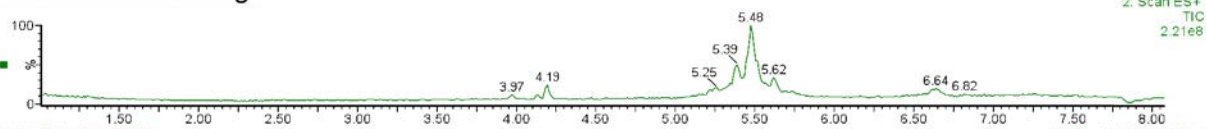
Mass spectrometry



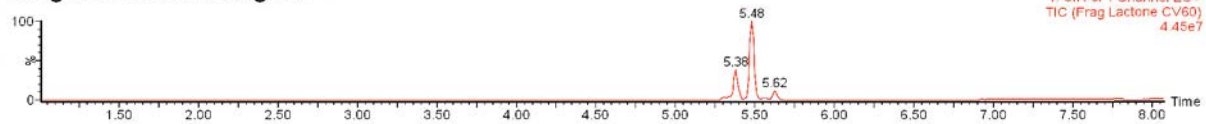
O

M16 M/Z H+ = 414 Rt = 5,38 min

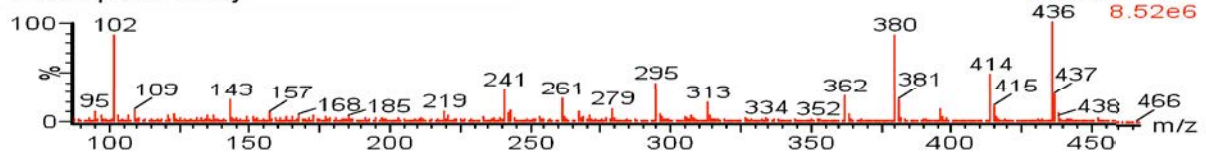
Total Ion Recording



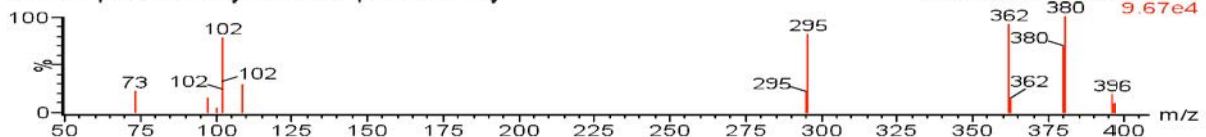
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



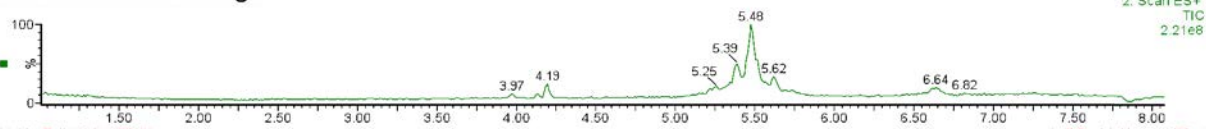
Mass spectrometry / Mass spectrometry



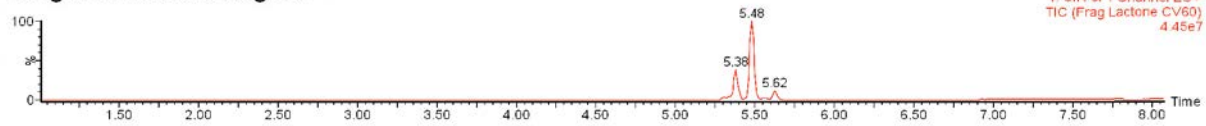
P

M16 M/Z H+ = 356 Rt = 5,49 min

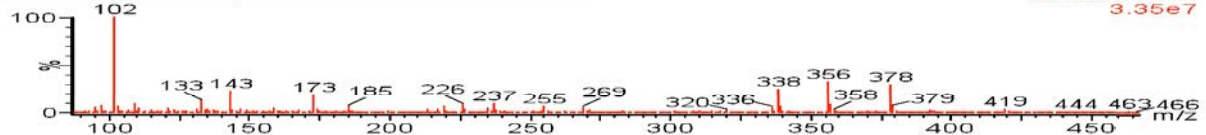
Total Ion Recording



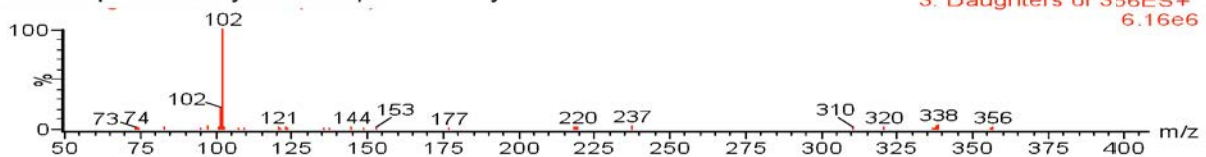
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



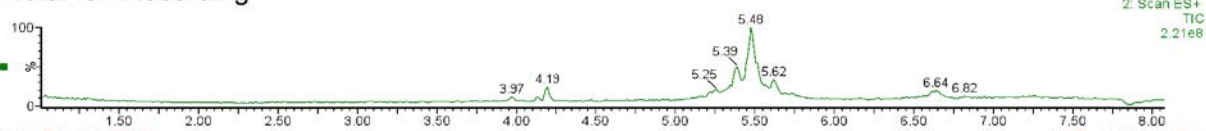
Mass spectrometry / Mass spectrometry



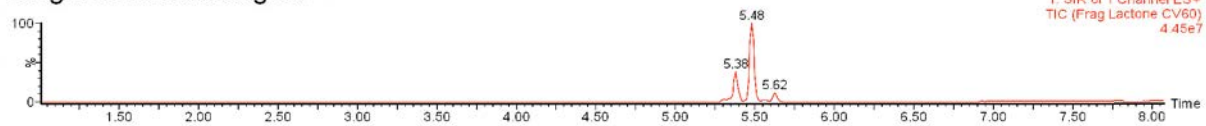
Q

M16 M/Z H+ = 382 Rt = 5,62 min

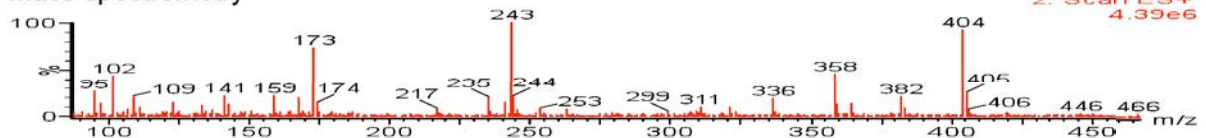
Total Ion Recording



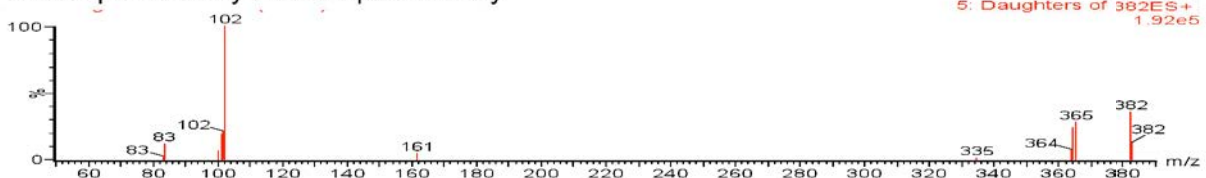
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



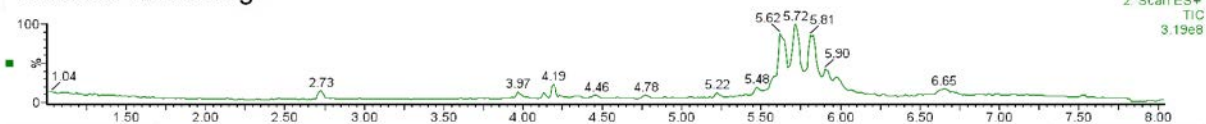
Mass spectrometry / Mass spectrometry



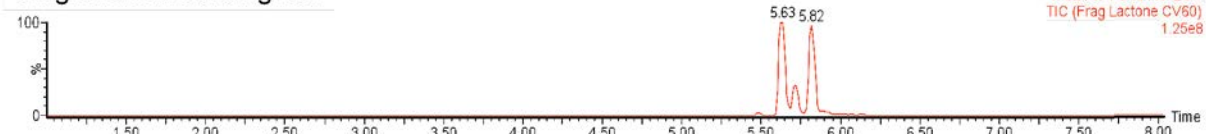
R

M17 M/Z H+ = 338 Rt = 5,71 min

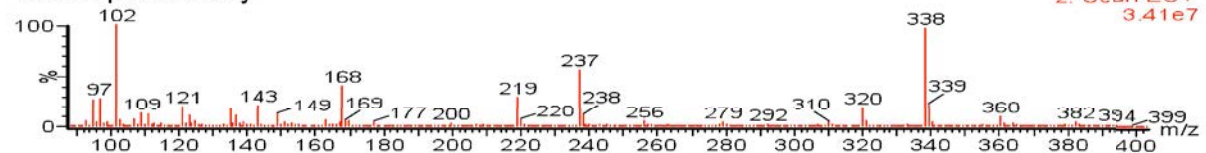
Total Ion Recording



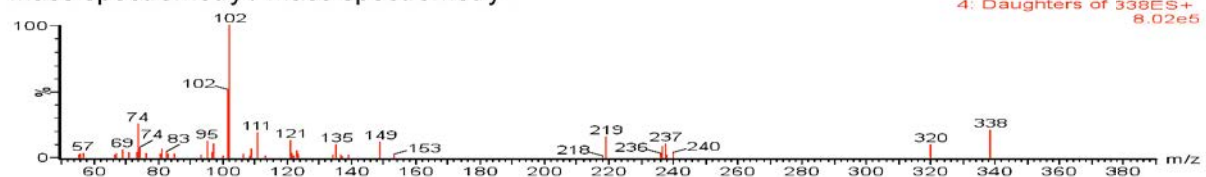
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



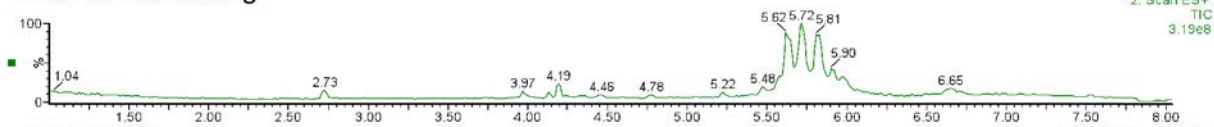
Mass spectrometry / Mass spectrometry



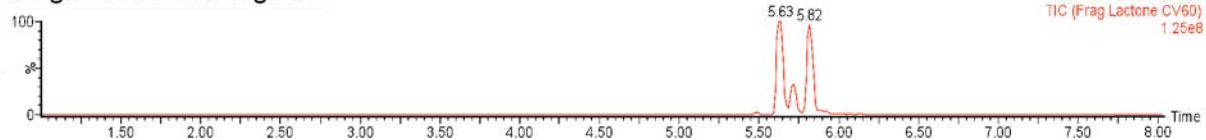
S

M17/18 M/Z H+ = 370 Rt = 5,79 min

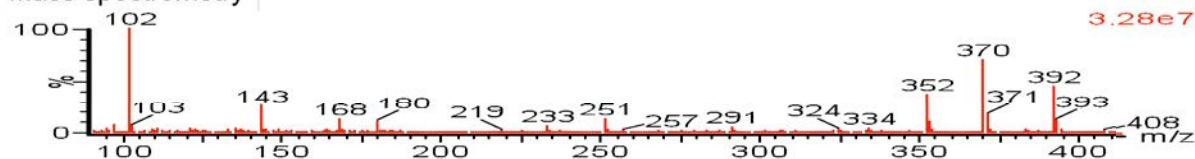
Total Ion Recording



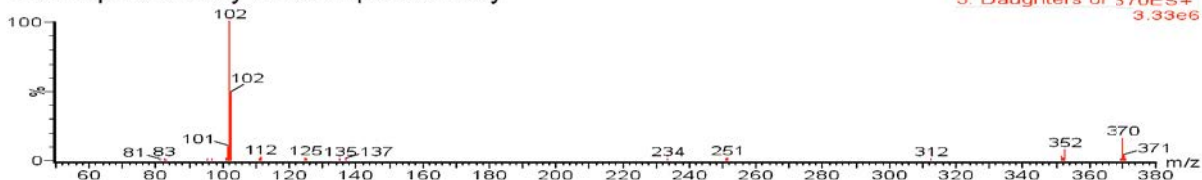
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



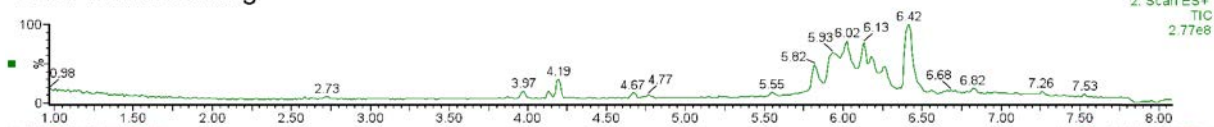
Mass spectrometry / Mass spectrometry



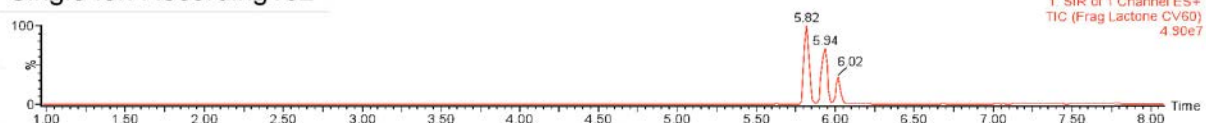
T

M18 M/Z H+ = 396 Rt = 5,93 min

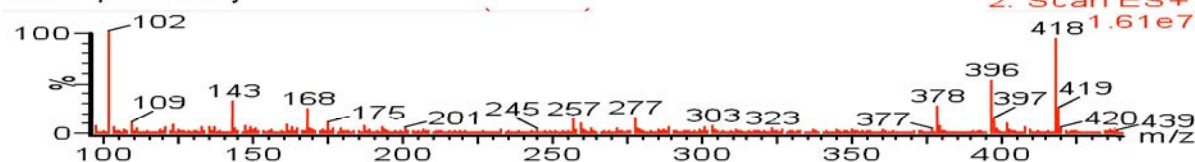
Total Ion Recording



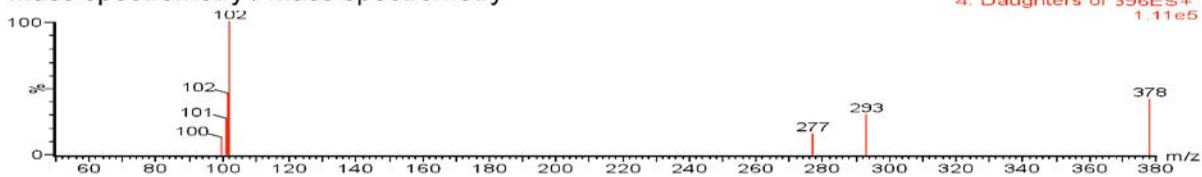
Single Ion Recording102



Mass spectrometry



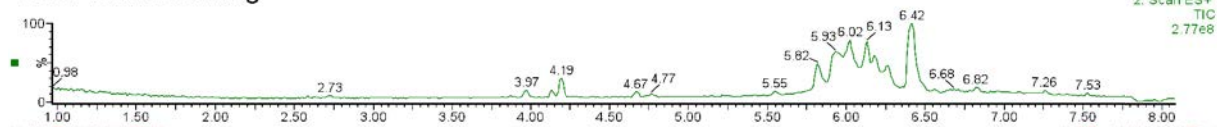
Mass spectrometry / Mass spectrometry



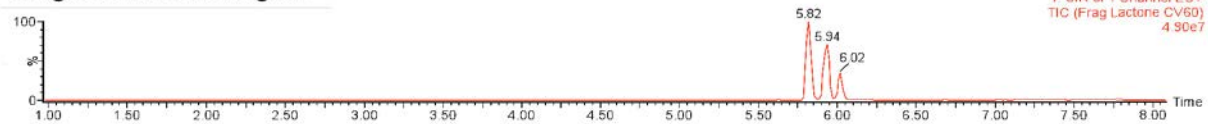
U

M18 M/Z H+ = 352 Rt = 5,80 min

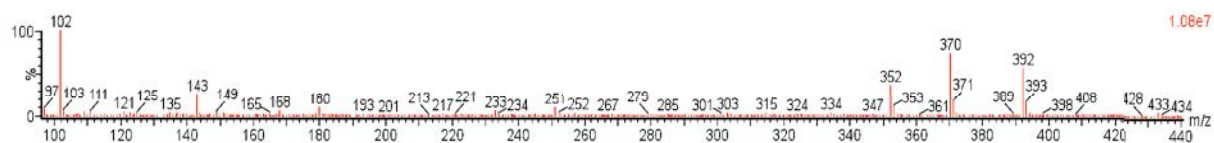
Total Ion Recording



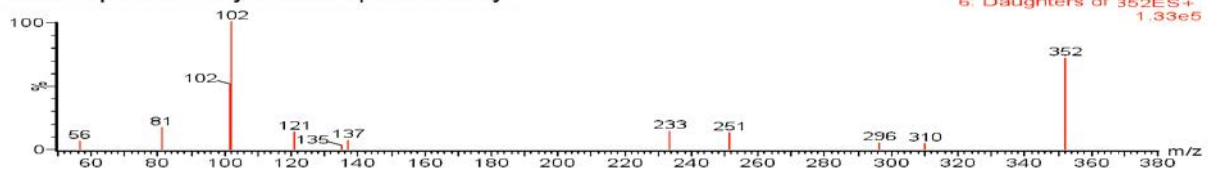
Single Ion Recording102



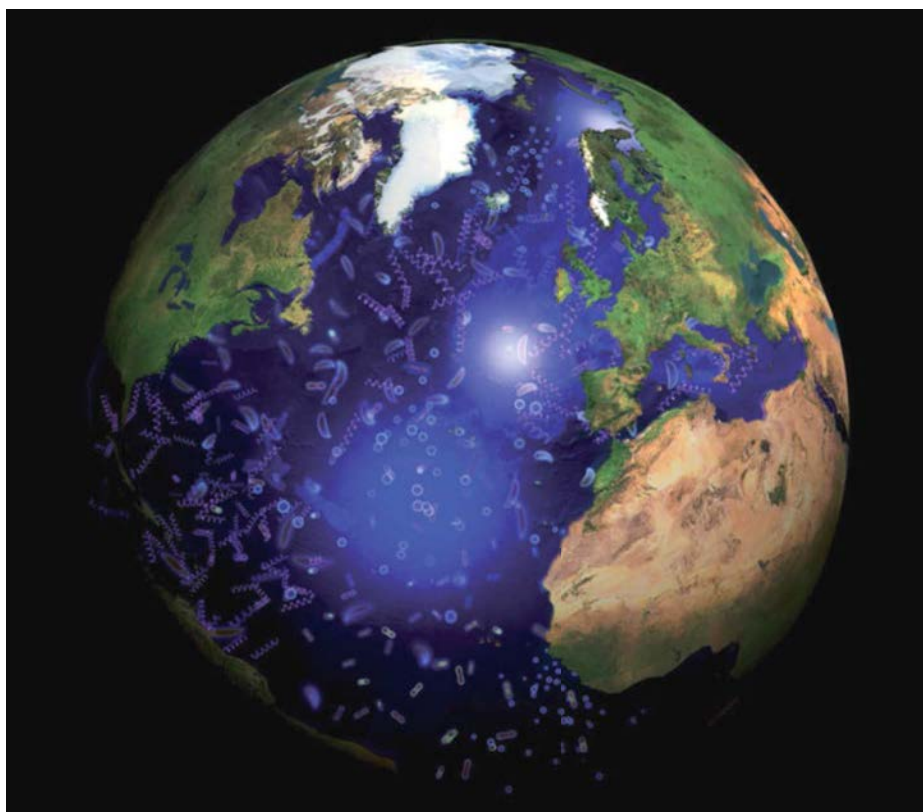
Mass spectrometry



Mass spectrometry / Mass spectrometry



Chapitre III :



**Diversity of quorum sensing autoinducer
synthases in the Global Ocean Sampling
metagenomic database**

Chapitre III : Publication : Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling metagenomic database

Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling metagenomic database.

DOBERVA Margot¹, SANCHEZ-FERANDIN Sophie², TOULZA Eve³, LEBARON Philippe¹, LAMI Raphaël^{1,*}

Published to *Aquatic Microbial Ecology*

¹UPMC Univ Paris 06, USR 3579, LBBM, 66650 Banyuls sur mer, France,

¹CNRS, USR 3579, LBBM, 66650 Banyuls sur mer, France,

²UPMC Univ Paris 06, UMR 7232, BIOM, 66650 Banyuls sur mer, France,

²CNRS, UMR 7232, BIOM, 66650 Banyuls sur mer, France,

³UPVD Univ Perpignan, UMR 5244, 2EI, 66860 Perpignan cedex 9, France,

³CNRS, UMR 5244, 2EI, 66860 Perpignan cedex 9, France,

*Corresponding author: raphael.lami@obs-banyuls.fr

Keywords: Quorum sensing, Acyl-homoserine lactone synthases, Global Ocean Sampling, Environmental metagenomic.

running title : Quorum sensing in GOS metagenome

The authors declare no conflict of interest

Abstract

Quorum sensing is a density-dependant mechanism allowing bacteria to synchronize their genetic expression, enhancing the coordination of their physiological activities. This cell-to-cell signalling pathway is mediated by autoinducers (AI), including 1) acyl-homoserine lactones (AHLs or AI-1), produced by *Proteobacteria* using AinS, LuxI and HdtS synthase families and 2) furanosyl-diester-borate (FDB or AI-2), produced by a large range of phylogenetically diverse bacteria and synthesized by the LuxS family. Quorum sensing has been described in detail in a few strains of importance in the biomedical and agronomic fields. By contrast, few data have been collected about the presence and importance of this mechanism in natural environments, and in particular in marine waters using culture independent methods. In this study, we examined the presence and the diversity of AI-1 and AI-2 synthases in the Global Ocean Sampling (GOS), a large metagenomic database, covering 68 stations through 3 oceans. We built 4 reference protein databases with maximal phylogenetic coverage containing all known AI synthase sequences to retrieve AI synthase sequences from the GOS metagenomes. We retrieved 29 environmental sequences affiliated to LuxI (synthesizing AI-1), 653 related to HdtS (AI-1), 31 related to LuxS (AI-2) and only one for AinS (AI-1). Interestingly AI synthase sequences were found in the 3 oceans covered by the GOS cruise and spanned a large phylogenetic diversity. Altogether, these data revealed a large number of new marine AI sequences, suggesting that quorum sensing based on AI-1 diffusion is a widespread mechanism in the marine environment.

Introduction:

Quorum sensing (QS) is a cell-to-cell bacterial communication mechanism, allowing bacteria to sense their population density (Nealson 1977) and coordinate their gene expression levels (Bassler 1999, Fuqua & Greenberg 2002) and physiological activities (Miller & Bassler 2001b). To perform quorum sensing-based communication, bacteria produce, secrete and accumulate small hormone-like molecules named autoinducers (AI) in the nearby environment (Fuqua et al. 1994). As the cell density increases, the concentration of these AI increases, and when a given threshold concentration is reached, targeted bacterial partners can respond to these compounds and modify their gene expression, and thus their behaviour and phenotype (Withers et al. 2001, Bassler 2002). It has been shown that QS systems regulate and synchronize activities like biofilm production (Parsek & Greenberg 2005, Dickschat 2010), nodulation (Cha et al. 1998, Loh, Pierson, et al. 2002), bioluminescence (Waters & Bassler 2005), virulence factor production (Smith & Iglewski 2003) and many others (Diggle, Crusz, et al. 2007). The coordination of bacterial community activities conveys an ecological advantage to the population (Case et al. 2008).

QS mechanisms are well described in medical or agronomic model bacterial strains (Cha et al. 1998, Loh, Pierson, et al. 2002) known for their pathogenicity (Kievit & Iglewski 2000) or bioengineering potential (March & Bentley 2004, Brenner et al. 2008). By contrast, little attention has been paid to QS in the functioning of natural microbial communities, including in marine waters (Decho et al. 2010). This is because bacterial densities in seawater (10^5 – 10^6 cells per ml) are typically below the known thresholds that enable QS (Mohamed et al. 2008). However at a micrometer scale many ecological niches, such as organic matter particles or microalgal blooms, harbour bacterial concentrations compatible with QS (Gram et al. 2002, Mohamed et al. 2008). In support of this hypothesis, potential for QS in planktonic

marine bacteria has been reported in many cultivated strains. These results were acquired either by directly detecting communication compounds or inferred by sequencing genes involved in QS in *Proteobacteria* (Gram et al. 2002, Wagner-Döbler et al. 2005).

The AI synthases are the key enzymes involved in AI production. It is now well established that the acylhomoserine lactones synthases (AHL synthases or AI-1 synthases) are encoded by 3 groups of genes: *luxI*-like (Engebrecht & Silverman 1984), *ainS*-like (Gilson et al. 1995) and *hdtS*-like (Laue et al. 2000, Burton et al. 2005, Rivas et al. 2007). By contrast, *luxS*-like genes encode the (2*S*,4*S*)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate synthase or *S*-THMF-borate synthase or furanosyl diester borate synthase or (2*R*,4*S*)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran synthase or *R*-THMF synthase, also known as the AI-2 synthases (Miller et al. 2004, Xavier & Bassler 2003). The AI-1 synthases have been identified in cultivated marine strains from the groups *Roseobacter* and *Vibrio* (Gram et al. 2002, Wagner-Döbler et al. 2005, Schaefer et al. 2002) and the AI-2 (Chen et al. 2002) have been observed in *Vibrio* genus (Bassler et al. 1997, Bassler 1999). By contrast, very little attention has been paid to the diversity of AI synthases in whole marine microbial communities. As only 1% of marine bacterial communities in the water column are readily cultivable by standard methods (Amann et al. 1995), an overview of potential QS mechanisms in the marine environment remains largely incomplete.

The Global Ocean Sampling (GOS) database is a large collection of marine metagenomes from 68 sampling sites. A total of 6.3 billion bp were Sanger sequenced from microplankton samples (Rusch et al. 2007) from which the metaproteome (all coding sequences) was also predicted (Yooseph et al. 2007). The GOS datasets mainly comprise sequences from the free-living fraction (FL) of bacterioplankton (0.1–0.8 µm pore size filter). Additionally, for 8 stations, the particle-attached fraction (PA) (0.8–3 µm) has been sequenced too (GS000, GS001, GS048, GS108, GS110, GS112, GS117 and GS122). The

GOS offers a large snapshot of the diversity and functional potential of marine microbial communities and has been successfully explored, for example, for the potential to utilize selenium (Zhang & Gladyshev 2008) or to metabolize various chemical forms of iron (Toulza et al. 2012).

In this study, we investigated the diversity patterns of QS AI synthases in the bacterial communities represented in the GOS metagenomes. We report the presence, the large diversity of both AI-1 and AI-2 synthase sequences and their distribution throughout the 3 oceans covered by the GOS expedition and we highlight new sequences of AI synthases.

Materials & Methods

Construction of reference databases for AI synthase proteins

We built a total of 4 databases, one for each family of AI synthases: AinS-like, LuxI-like, HdtS-like and LuxS-like. Following the approach described in Toulza et al (2012), we first selected protein sequences that have been functionally characterized in previous publications. To improve taxonomic coverage, we added to our reference databases additional sequences annotated as AI synthase from the GenBank non-redundant (NR) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Each database was aligned using Clustal W (Larkin et al. 2007) in Jalview (Waterhouse et al. 2009) to discard redundant and partial sequences. Our final AI databases comprised 569 LuxI, 30 AinS, 214 HdtS and 297 LuxS annotated protein sequences.

Screening for AI synthases in the GOS metagenome

The Global Ocean Sampling Expedition and its subsequent metagenome analysis have been described previously (Rusch et al. 2007, Yooseph et al. 2007). Briefly, 200 L of seawater were collected at 68 different sampling stations and were filtered onto 4 different successive filters with a porosity of 20 μm , 3 μm , 0.8 μm , and 0.1 μm . In this work we discarded 10 stations where no AI sequences were found (GS006, GS038-040, GS042-046, GS050). In our study, we also focused on both FL (0.1–0.8 μm) and PA (0.8–3 μm) fractions, which constitute the most complete sequence datasets in terms of sequencing effort. The GOS database contains sequences collected from various habitats within the Atlantic, Pacific and Indian Oceans. A total of 11 different habitat types were sampled, including open ocean (23 stations), coastal (22 stations), coral reefs (4 stations), estuary (2 stations) and 7 others (Rusch et al. 2007). Environmental variables were also retrieved from (Venter et al. 2004, Rusch et al. 2007).

The detection of AI-1 and AI-2 synthases from the GOS database (proteins predicted from reads) was conducted by sequence homology searches using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algorithm (Altschul et al. 1990) and our AI synthase databases as the query sequences. All our AI protein BLASTp searches were performed using the CAMERA portal (<http://camera.calit2.net/about/gos.shtm>) (Sun et al. 2011) using blastall default parameters (Seshadri et al. 2007) (<http://camera.calit2.net/workflows/blast.shtm>, including FL and PA fractions). A Reciprocal Best BLAST Hit (RBH) analysis (Moreno-Hagelsieb & Latimer 2008) was then performed on the sequences retrieved from the GOS dataset. Briefly, putative environmental AI synthases were searched against NR database and those GOS sequences with a RBH to the same annotated AI synthases were assigned to the gene and designated as most related to that taxon.

We also compared the distribution of AI environmental protein sequences in the both the FL and PA fractions from the 8 GOS sampling stations for which this data are available. We pooled all the retrieved AI protein sequences from PA and FL fractions from all 8 sites, and clustered the environmental and annotated protein sequences using CD-HIT (Li & Godzik 2006, Fu et al. 2012). The clustering parameters were 40% sequence identity and a word size equal to 2. The differences in the number of environmental sequences affiliated to HdtS between the FL and PA fractions were tested for significance using a Wilcoxon test with R (www.r-project.org).

Normalization of AI counts in GOS metagenomes to single copy genes

The number of sequences matching to AI synthases in the GOS was normalized to the number of RpoB protein sequences present in the sample. That gene is present in only single copy in bacterial genomes and is not prone to horizontal transfer and thus is also a good taxonomic marker (Case et al. 2007). Following the same procedure as described for the AI sequences, we built an RpoB protein reference databases with a large taxonomic coverage

containing 1000 sequences. We finally reported the number of each family of AI environmental sequences related to our reference sequences relative to the number of RpoB protein sequences in the GOS dataset. This allows normalization to the number of bacterial genomes in the dataset.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were conducted for each targeted family of AI synthase. All environmental and annotated sequences were aligned using Clustal W (Larkin et al. 2007) in MEGA 5.1 software (Tamura et al. 2011) and alignments adjusted manually. Phylogenetic trees were constructed using both Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) methods for each kind of AI synthase protein sequence alignments. NJ analyses were conducted with gamma correction and 1000 bootstrap replicates. Protein model selection was performed from each protein dataset and then, phylogenetic analyses were conducted with the selected models (WAG model for LuxI, HdtS and LuxS) using gamma correction and 100 bootstrap replicates. As we obtained congruent topologies from the two methods, only those obtained by NJ are presented here but when useful, percentage of bootstrap support are obtained by ML searches are also mentioned.

Results

Features of AI synthase protein reference databases

All our reference databases were built to have as broad a taxonomic coverage as possible consisting of protein sequences assignable to AI synthases from the NR database at the time this study was conducted. The LuxI, LuxS, HdtS-like protein family databases had a large taxonomic coverage, which included the α - β - γ - and δ - lineages of *Proteobacteria*. The LuxS protein reference database also contained annotated sequences from Spirochaetes, Bacteroidales and the Gram-positive Firmicutes and Actinobacteria. The AinS family, limited to the Vibrionaceae, contained not only AinS but also LuxM and VanM synthases (AinS-like synthases). A total of 634 annotated protein sequences from NCBI were affiliated to LuxI with a mean identity of 27% (number of conserved amino acids divided by total amino acids), 214 sequences to HdtS with a mean identity of 27%, 297 sequences to LuxS with a mean identity of 78% and 30 sequences to the AinS with a mean identity of 34% (**Tableau 5**). The mean length of these sequences was about 380 amino acids for AinS, 200 for LuxI, 250 for HdtS and 170 for LuxS.

Tableau 5 : Protein families and environmental sequences features.

Protein families	AinS	LuxI	HdtS	LuxS	RpoB
Number of annotated sequences	30	569	214	297	1000
Conservation (%)	34	27	27	78	62
Average number of amino acids	380	200	250	170	1200
Taxonomic affiliation	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Proteobacteria</i>	α , β and γ <i>Proteobacteria</i>	All Bacterial phyla	All Bacterial phyla
Number of GOS stations where sequences were found	1/58	9/58	57/58	3/58	58/58
Total number of environmental sequences retrieved in GOS	1	29	653	31	4293
Ratio: number of environmental sequences to number of RpoB copies	0.02 %	0.7 %	14.8 %	0.7 %	100 %

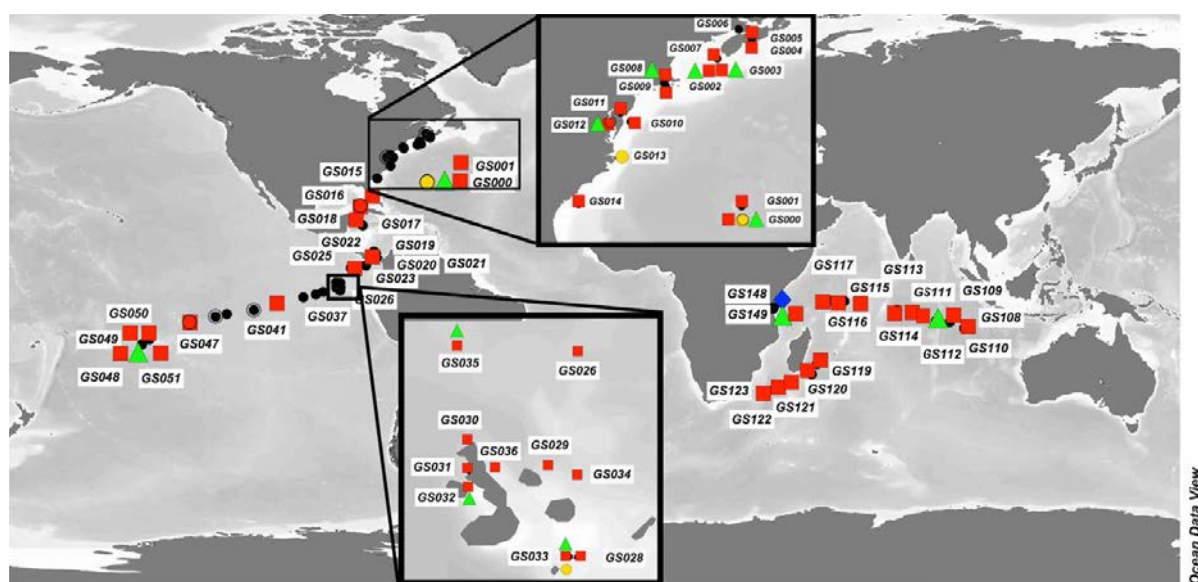


Figure 31 : Geographic distribution of AI-1 (LuxI, HdtS and AinS-like sequences) and AI-2 (LuxS sequences) retrieved from the GOS metagenomes.

GOS sampling stations where no AI sequences were found are represented with black dots; blue diamonds locate the presence of AinS affiliated sequences; green triangles indicate LuxI affiliated sequences; red squares show HdtS affiliated sequences location; yellow dots report LuxS affiliated environmental sequences position. To display the geographic repartition of the environmental sequences related to the 4 different protein families (AinS, LuxI, HdtS and LuxS) a geographic map was built using Ocean Data View software version 4 (ODV Schlitzer, R., Ocean Data View, <http://odv.awi.de>, 2013).

Abundance and diversity of LuxI synthases in the GOS dataset

We retrieved 29 sequences related to LuxI AHL synthases in the GOS dataset. Those sequences are distributed over 10 stations of the GOS cruise (**Table 5, Figure 31**) and appeared related to a large taxonomic diversity of AI-1 sequences in NCBI. These GOS sequences were aligned with annotated sequences and phylogenetic reconstruction was performed (**Figure 32**). All affiliated environmental sequences issued from *α -Proteobacteria* (**Figure 32**). Nineteen environmental sequences (65%) matched with sequences belonging to Rhodobacterales (Rhodobacteraceae family), two (7%) with sequences belonging to Sphingomonadales (Sphingomonadaceae family) and three (14%) with sequences belonging to Rhizobiales (Bradyrhizobiaceae and Beijerinckiaceae families) (**Figure 32**). These affiliations were supported by strong NJ bootstrap percentages (>99 for Rhodobacterales; 100 for Sphingomonadales; 97 and 100 for Rhizobiales, **Figure 32**) and also in some cases by strong ML bootstrap percentages. Although well identified as AI-1 synthases by RBH, a large fraction of environmental sequences (14%) could not be unambiguously related to any annotated sequences.

LuxI sequences issued from PA fractions represented 10% of total retrieved LuxI sequences in the GOS dataset. These sequences were present at stations GS048 and GS110. All these sequences appear enclosed in a larger phylogenetic group (defined with bootstraps values of 53/86 for NJ/ML respectively, **Figure 32**) comprising members of the Sphingomonadaceae family.

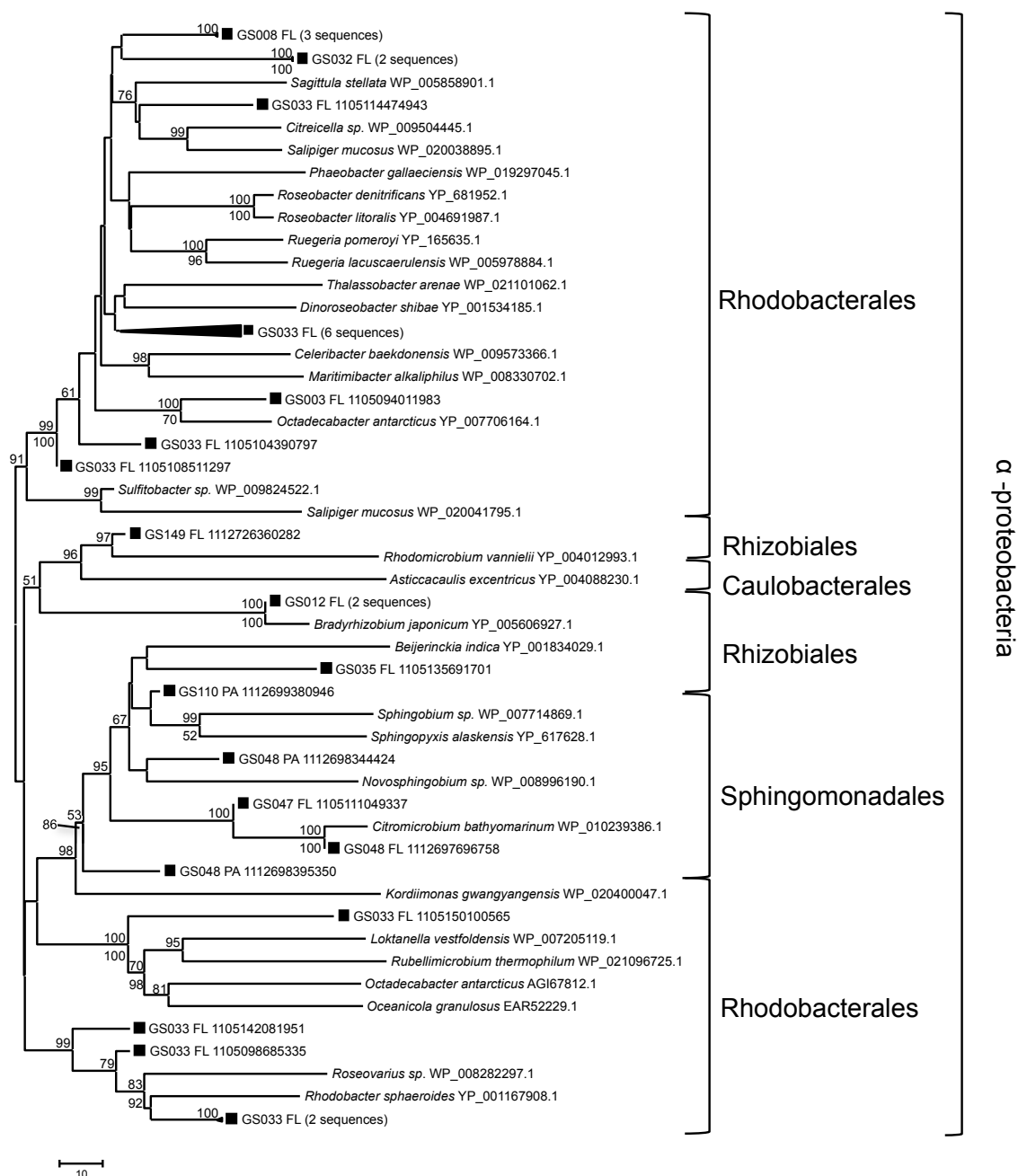


Figure 32 : Phylogenetic tree of annotated and environmental LuxI protein sequences.

Phylogenetic tree of annotated and environmental sequences predicted from GOS metaproteome LuxI protein sequences produced using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap replicates. Black squares indicate environmental sequences. The label FL indicates the sequences retrieved from free-living fractions. The label PA indicates the sequences retrieved from particle-attached fractions.

Abundance and diversity of HdtS synthases in the GOS dataset

A total of 653 environmental sequences related to HdtS were retrieved from the GOS metagenomes (**Table 5**). Those sequences were found in all oceans crossed by the GOS expedition and in a large number of stations (57 different stations over a total of 58 sampled by the expedition) (**Figure 33**). Collectively, all of these sequences were related to α - β - and γ - *Proteobacteria*. More precisely, a large fraction (19% or 127 sequences) of these sequences were related to the SAR 11 group (α - *Proteobacteria*, with bootstrap supports of 100 and 96 for NJ and ML respectively), including its cultivated representative member *Pelagibacter ubique* (indicated by “SAR11” sequences, **Figure 33**). A lower fraction (3% or 21 sequences) of these sequences was related to the SAR 116 group (α - *Proteobacteria*, with bootstrap supports of 95 and 67 for NJ and ML respectively, **Figure 33**). Interestingly, one sequence was strongly associated to a sequence from *Oceanicaulis* (Rhodobacterales), which belongs to the Hyphomonadaceae family (bootstrap supports of 100 and 83 for NJ and ML respectively). Among γ - *Proteobacteria*, a large fraction of sequences were related to the SAR86 group (23% or 153 sequences) with high bootstrap supports both in NJ and ML methods (100 and 62 respectively, **Figure 33**). One sequence was related to Pseudomonadales, and a large fraction (21% or 140 sequences) appeared more closely related to other orders within γ - *Proteobacteria* (Oceanospirillales, Chromatiales, Acidithiobacillales and Triotrichales). Lastly, a significant number of sequences appeared closely related to the β - *Proteobacteria* (represented by the Burkholderiales order, 19% or 126 sequences) and unclassified γ - *Proteobacteria* (5% or 32 sequences) with relatively strong bootstrap supports (63 and 57 for NJ and ML respectively, **Figure 33**).

A few environmental sequences (19%) were recovered from the 8 sampling stations covering both the FL and PA fractions. Overall, a total of 63 sequences were recovered from the PA fraction. Interestingly, the two sequences GS051 FL and GS117 PA were more closely

related (NJ bootstrap of 98) and found within in the SAR11 α - Proteobacterial group. Six sequences from the PA fraction of the GS110 sampling site were recovered together and closely related to the γ -Proteobacteria, *Francisella tularensis* (NJ bootstrap of 97, **Figure 33**). To test if there was any difference in the taxonomic composition between the FL and the PA fractions, we clustered all HdtS sequences using a threshold of 40% sequence identity, and found a total of 14 clusters (**Table 6**). As an example, cluster 6 contains environmental sequences related to SAR86 clade in the two fractions of the GOS stations GS000, GS110 and GS112 (Table 2). In the environmental sequences, of which 11% of were from the FL fraction and 15% from the PA fraction, we did not find any significant difference between the cluster affiliations of environmental sequences distributed in the two metagenome fractions (Wilcoxon test, p-value = 0.83).

Tableau 6 : Comparison of HdtS phylogenetic clusters abundances (in % of total sequences) in the FL and PA fractions over 8 GOS stations.

HdtS sequences were clustered with CD-HIT software at 40% identity. Statistical analysis on these data revealed no significant difference of HdtS diversity between the two fractions (see main text methods and results for details).

Phylogenetic affiliation of protein sequences clusters		FL fraction	PA fraction
Cluster 1	<i>Luminiphilus/Congregagibacter</i>	0%	3.1%
Cluster 2	<i>Alcalinivorax</i>	7.1%	8.7%
Cluster 3	<i>Oceanocaulis/SAR116</i>	3.1%	1.6%
Cluster 4	<i>Roseobacter</i> clade	0.8%	0%
Cluster 5	<i>Hahella/Methyloglobulus</i>	7.1%	5.5%
Cluster 6	SAR11	8.7%	9.5%
Cluster 7	SAR86	11.1%	15%
Cluster 8	Non affiliable environmental sequences	3.9%	2.3%
Cluster 9		3.1%	0.8%
Cluster 10		3.1%	0.8%
Cluster 11		0%	1.6%
Cluster 12		0%	0.8%
Cluster 13		0.8%	0%
Cluster 14		0.8%	0%
Total		50%	50%

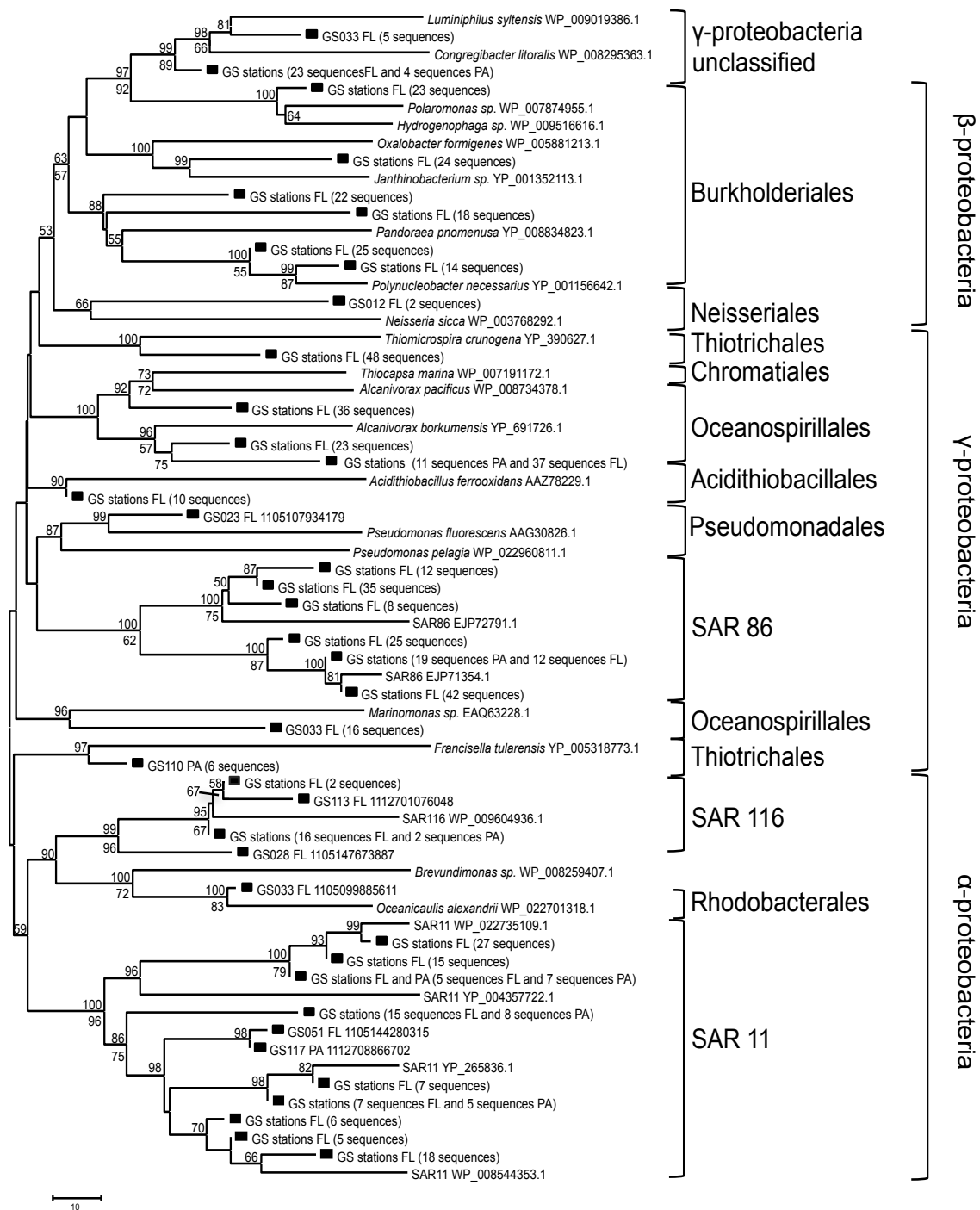


Figure 33 : Phylogenetic tree of annotated and environmental HdtS protein sequences

Phylogenetic tree of annotated and environmental HdtS protein sequences produced using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap replicates. Black squares indicate environmental sequences. The label FL indicates the sequences retrieved from free-living fractions. The label PA indicates the sequences retrieved from particle-attached fractions.

Abundance and diversity of LuxS synthases in the GOS dataset

A total of 31 environmental sequences related to LuxS were detected in the GOS dataset at 3 sampling sites: GS000, GS013 and GS033 (**Table 5; Figure 31**). All environmental sequences affiliated to luxS were retrieved from the FL fractions. As previously noted, the LuxS family showed the widest taxonomic coverage compared to the other families. The environmental sequences found were related to γ -Proteobacteria (97% or 30 sequences, NJ and ML bootstraps of 100% and 99% respectively, Figure 4) and to the Gram-positive bacteria from the Deinococcales (3% or 1 sequence, NJ and ML bootstraps of 100% and 90% respectively, **Figure 34**). Among γ -Proteobacteria, 4 sequences (13%) group inside a clade found in both NJ and ML phylogenies, comprising sequences from *Alishewanella* and *Rheinheimera* species (ML bootstrap of 92%, **Figure 34**), but which were more closely related to *Reinheimera* (NJ and ML bootstraps of 93% and 91% respectively, **Figure 34**). A large amount of environmental sequences (65% or 20 sequences) seemed related to *Shewanella* species, although it was not well statistically supported (except two GS000a sequences with *Shewanella frigidimarina*, ML bootstrap of 60%).

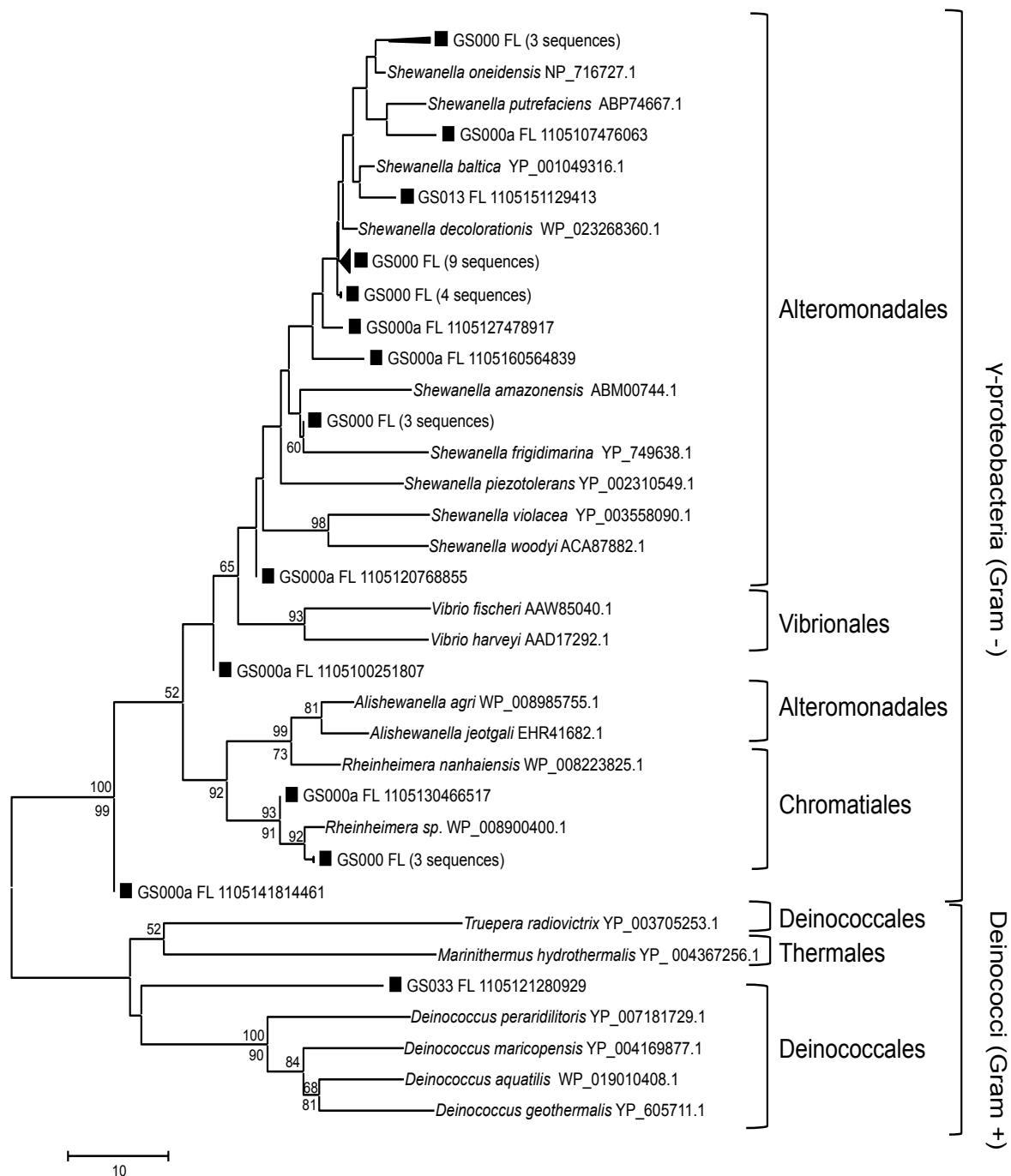


Figure 34 : Phylogenetic tree of annotated and environmental LuxS protein sequences.

Phylogenetic tree of annotated and environmental LuxS protein sequences produced using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap replicates. Black squares indicate environmental sequences. The label FL indicates the sequences retrieved from free-living fractions. The label PA indicates the sequences retrieved from particle-attached fractions.

Diversity of AinS synthases in the GOS dataset

We retrieved only 1 sequence of AinS into the GOS dataset, located at the station 148, in the Indian Ocean, close to the Zanzibar coast in a fringing reef. The top high scoring BLAST pair was “N-(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone synthase luxM” (WP_002541906.1) (70% sequence coverage and 90% identity) from *Grimontia sp.*, a Vibrionaceae family member (**Figure 31**).

Correlation with environmental variables

For the LuxI group we found no correlation with the environmental data. For HdtS family there was a positive correlation with metagenome size, and negative correlation between chlorophyll (Spearman, $p = 0.002$; $r = -0.425$), nitrate (Spearman, $p = 5.475 \cdot 10^{-05}$; $r = -0.553$), silica concentration (Spearman, $p = 2.481 \cdot 10^{-05}$; $r = -0.573801$), primary production (Spearman, $p = 0.01$; $r = -0.374$) and the number of environmental sequences related to HdtS. A link with LuxS related environmental sequences and salinity was also observed (Spearman, $p = 0.020$; $r = 0.341$). We did not find any correlation with the other environmental variables (temperature, iron concentration, types of habitat) (**Table 7**).

Tableau 7 : Correlation tests between sequencing effort or environmental variables and AI synthase abundance.

We first checked for each station if the number of environmental sequences was related to metagenome size with the Spearman coefficient. Then we verified the existence of a significant relationship between environmental variables and the number of environmental sequences retrieved for each AI family, normalized by the number of potential bacterial genomes at each GOS station (assessed by rpoB, see methods for details). We used a Spearman correlation test (discrete quantitative variables, non normal). For sequence-habitats correlation a Kruskal-wallis test was used (non-parametric, qualitative data against quantitative).

Station metagenome size	Observed stat	10795.42	29835.53	21963.30
	p-value	$4.425 \cdot 10^{-08}$	0.8070	0.0297
	rho	0.6501	0.0331	0.2882
Temperature	Observed stat	25650.83	28923.05	29455.69
	p-value	0.5881	0.7531	0.6497
	rho	0.0746	-0.0434	-0.0626
Salinity	Observed stat	17155.63	17576.5	10683.97
	p-value	0.7018	0.579	0.0203
	rho	-0.0580	-0.0840	0.3411
Chlorophyll	Observed stat	27924.82	16952.69	17674.31
	p-value	0.0023	0.3548	0.5018
	rho	-0.4247	0.1350	0.0967
Fe	Observed stat	18117.4	21233.64	15623.73
	p-value	0.7512	0.1238	0.5179
	rho	-0.0474	-0.2277	0.1239
NO ₃	Observed stat	26867.15	15388.56	14099.07
	p-value	$5.475 \cdot 10^{-05}$	0.4605	0.34
	rho	-0.5534	0.1102	0.1848
Si	Observed stat	27220.46	12747.96	16131.44
	p-value	$2.481 \cdot 10^{-05}$	0.0741	0.6529
	rho	-0.5738	0.2629	0.0673
PP	Observed stat	23759.31	13477.96	14815.8
	p-value	0.0097	0.1359	0.3363
	rho	-0.3737	0.2207	0.1434
Habitat type	chi-squared	23.5216	23.9168	17.2158
	p-value	0.0737	0.0665	0.3061
	df	15	15	15

Discussion

Our study reveals the presence of AI-1 and 2 synthases, key enzymes in quorum sensing pathways, within the GOS predicted metaproteome. To date, QS genes have only been directly found in cultured marine bacteria (Gram et al. 2002, Wagner-Döbler et al. 2005, Engebrecht et al. 1983, Gilson et al. 1995) or indirectly inferred from AHL production and genome sequence annotation (Mohamed et al. 2008, Cuadrado-Silva et al. 2013, Doberva et al. 2014a,b). By contrast, no previous studies have examined the presence and the diversity of those genes in the marine water column using culture-independent approaches.

We detected a large phylogenetic diversity of AI synthases in the GOS metagenomic libraries. However, it has not been possible to affiliate a large fraction of the retrieved sequences at a fine phylogenetic scale, as only a few marine cultivated strains harbour AI synthases genes that would allow a more accurate taxonomic association. At a higher phylogenetic level, the AI sequences retrieved from the GOS were affiliated to many different groups of bacteria. LuxI environmental sequences were mainly related to Rhodobacterales (Cude and Buchan 2013), Shingomonadales and Rhizobiales, while HdtS sequences were mainly related to SAR11 and Pseudomonadales. These results have to be very carefully interpreted, as it has been demonstrated that the phylogenetic signal in AI sequences may be affected by large horizontal transfer between bacterial groups (Gray & Garey 2001, Lerat & Moran 2004). However, our data clearly increase the currently known diversity of AI sequences. This high percentage of AI sequences without close relatives from known species in the GOS datasets clearly demonstrate that QS potential is present in a much wider diversity of marine bacteria than previously suspected from cultivable marine bacteria.

We may have under-estimated the extent of AI diversity present in the GOS databases. Since our approach is based on sequence homology, we retained only the environmental

sequences that are close to known and annotated sequences in databases to avoid false positives. The high stringency of the search criteria (e-value 10^{-50} for first BLAST and E^{-20} for RBH) used in this study means it is possible divergent AI environmental sequences were missed. This means that all AI sequences we can detect are dependant on the number and diversity of annotated sequences currently available in the NCBI NR database. The diversity of AI synthases is probably much greater than detectable by homology searching. Despite this, the number of new AI sequences detected in this study was high, even though total diversity is still probably largely underestimated.

Another recurrent bias to assess when working with metagenomic datasets is the potential functional diversity of annotated proteins (Uchiyama & Miyazaki 2009, Prakash & Taylor 2012). Our work indicates the majority of AI-1 synthases in the GOS dataset are related to the *hdtS* gene family. HdtS is a member of the lysophosphatidic acid acyltransferase family (Laue et al. 2000) and harbours a dual functionality: acylation of lysophosphatidic acid (Cullinane et al. 2005) and AHL synthesis (Laue et al. 2000, Churchill & Chen 2011). The production of AHL based on HdtS has been well demonstrated experimentally in *Pseudomonas fluorescens* (Laue et al. 2000), *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Rivas et al. 2007) and *Nitrosomonas europaea* (Burton et al. 2005). When expressed in *Escherichia coli*, HdtS protein enabled the production 3-OH-C14:1-AHL, C10-AHL, and C6-AHL (Laue et al. 2000). One possible mechanism is that HdtS could transfer acyl chains from acyl-ACP or acyl-CoA to S-Adenosylmethionine to generate AHLs (Cullinane et al. 2005). Although the experimental evidence accumulated from the strains mentioned above indicates a strong link with AHL production, the large diversity of HdtS found in the GOS metagenomic libraries highlights the need to further confirm a role of these diverse HdtS in QS.

Our results did not reveal any major difference in AI diversity for HdtS between the FL (0.1–0.8 μm) and PA (0.8–3 μm) fractions. It is commonly thought that bacteria in

seawater occur in low densities and thus AHLs molecules produced by a cell would quickly be diluted before reaching a receiving cell, hampering QS (Hmelo & Van Mooy 2009). Thus, a recurrent hypothesis is that QS in marine communities may have more chance to happen in particle-attached conditions where bacteria could be concentrated, like on the surface or inside a particle of sinking organic matter (Mohamed et al. 2008, Hmelo et al. 2011). The absence of a significant difference (Wilcoxon test, p -value = 0.83) in HdtS diversity distribution in between PA and FL fractions is not surprising as marine bacterial groups can present both FL and PA lifestyles (Ghiglione et al. 2007, Crespo et al. 2013). As the presence of QS genes is similar between PA and FL microenvironments, further studies need to focus on detecting differential expression of these genes. Interestingly, recent work conducted on *Dinoroseobacter shibae* tends to support this hypothesis (Patzelt et al. 2013).

The LuxI and HdtS AI-1 synthases sequences retrieved in this study were detected in metagenomic libraries from the Atlantic, Pacific and Indian Oceans covered by the GOS. This result highlights that AI synthase were present in a wide range of marine environmental conditions, including open and coastal oceans, coral reefs and salt marshes. This observation support the hypothesis that QS mechanisms may be widespread in many marine environments and opens the wider question of the potential role of QS in marine prokaryotic species. Furthermore the negative correlation between environmental sequences related to HdtS and environmental variables linked to coastal marine habitats suggest that HdtS was more prevalent in bacteria living in the open ocean.

Previous studies have revealed a wide phylogenetic distribution of the LuxS group among Proteobacteria, including the marine bacteria genera *Vibrio* (Bassler 1999) and *Shewanella* (Bodor et al. 2008), as well as within the Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidales, Deinococcales (*Deinococcus*) and Spirochaetes (Schauder et al. 2001, Lerat & Moran 2004). The involvement of LuxS in quorum sensing remains a matter of debate

(Rezzonico and Duffy 2008 and Platt and Fuqua 2010 and publications there in). However, many studies also report LuxS-based synthesized molecules as the initiators of a bacterial Esperanto (Winans 2002) *i.e.* allowing interspecies communication between bacteria. However our results show a low abundance and a narrow taxonomic coverage of luxS sequences retrieved from the GOS dataset. This may be due to the lifestyle of bacteria harbouring the AI-2 synthase that are frequently found in association with large organisms (Dworkin & Falkow 2006, Bodor et al. 2008) and thus may be undetectable with the protocols employed by the GOS cruise. Similarly, AinS AI synthases were very poorly represented in the GOS dataset. This result is perhaps not surprising as these AI synthases are known in only a few members of the Vibrionaceae (Milton et al. 2001) and therefore the low detection rate could be due to the small search database size. Interestingly, Rusch et al. (2007) also did not detect any member of the Vibrionaceae family in the GOS dataset based on 16S rRNA and *rpoB* gene analysis. This makes it more likely that the low number of AinS detected was due to the low sequence coverage of the GOS metagenomes being unable to detect rare members of the community such as Vibrionaceae. Again, these biases probably underestimated the real extent of marine AI diversity, which we have extended with this study.

Overall, our results show that diverse AI synthases genes are present in the marine environment, many are related to presently uncultivated bacteria, and our work revealed a large number of new AI sequences. It appears that AI synthases are diverse and present in all oceans crossed by GOS expedition, supporting the hypothesis that QS cell-to-cell bacterial communication systems are widespread in marine waters. Thus, this study opens the door to the wider questions of the conditions under which expression of these genes occurs and the potential role of QS in marine bacteria and ecosystems.

Aknowledgements

We thank Olivier Naret for his help in reference database constitution. We are grateful to the CNRS-UPMC ABiMS bioinformatics platform (<http://abims.sb-roscoff.fr>) for providing computational resources and support. This was supported by an Emergence UPMC grant.

Bibliography

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143–169

Bassler BL (1999a) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2:582–587

Bassler BL (1999b) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2:582–587

Bassler BL (2002) Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell* 109:421–424

Bassler BL, Greenberg EP, Stevens AM (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 179:4043–4045

Bodor A, Elxnat B, Thiel V, Schulz S, Wagner-Dobler I (2008) Potential for luxS related signalling in marine bacteria and production of autoinducer-2 in the genus *Shewanella*. *BMC Microbiol* 8:13

Brenner K, You L, Arnold FH (2008) Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol* 26:483–489

Burton EO, Read HW, Pellitteri MC, Hickey WJ (2005) Identification of Acyl-Homoserine Lactone Signal Molecules Produced by *Nitrosomonas europaea* Strain Schmidt. *Appl Environ Microbiol* 71:4906–4909

Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl Environ Microbiol* 73:278–288

Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S (2008) AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* 2:345–349

Cha C, Gao P, Chen Y-C, Shaw PD, Farrand SK (1998) Production of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by Gram-Negative Plant-Associated Bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11:1119–1129

Chen X, Schauder S, Potier N, Dorselaer A Van, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415:545–549

Churchill MEA, Chen L (2011) Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling. *Chem Rev* 111:68–85

Crespo BG, Pommier T, Fernández-Gómez B, Pedrós-Alió C (2013) Taxonomic composition of the particle-attached and free-living bacterial assemblages in the Northwest Mediterranean Sea analyzed by pyrosequencing of the 16S rRNA. *MicrobiologyOpen* 2:541–552

Cuadrado-Silva CT, Castellanos L, Arévalo-Ferro C, Osorno OE (2013) Detection of quorum sensing systems of bacteria isolated from fouled marine organisms. *Biochem Syst Ecol* 46:101–107

Cullinane M, Baysse C, Morrissey JP, O’Gara F (2005) Identification of two lysophosphatidic acid acyltransferase genes with overlapping function in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151:3071–3080

Decho AW, Norman RS, Visscher PT (2010) Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends Microbiol* 18:73–80

Dickschat JS (2010) Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* 27:343–369

Diggle SP, Crusz SA, Cámara M (2007) Quorum sensing. *Curr Biol CB* 17:R907–910

Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Croue J, Suzuki M, Lebaron P, Lami R (2014) Genome Sequence of the Sponge-Associated *Ruegeria halocynthiae* Strain MOLA R1/13b, a Marine Roseobacter with Two Quorum-Sensing-Based Communication Systems. *Genome Announc* 2

Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Joux F, Lebaron P, Lami R (2014) Genome Sequence of *Maribius* sp. Strain MOLA 401, a Marine Roseobacter with a Quorum-Sensing Cell-Dependent Physiology. *Genome Announc* 2:e00997–14

Dworkin M, Falkow S (2006) *The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer Science & Business Media

Engbrecht J, Nealson K, Silverman M (1983) Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32:773–781

Engbrecht J, Silverman M (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci* 81:4154–4158

Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl* 28:3150–3152

Fuqua C, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:685–695

Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176:269–275

Ghiglione JF, Mevel G, Pujo-Pay M, Mousseau L, Lebaron P, Goutx M (2007) Diel and Seasonal Variations in Abundance, Activity, and Community Structure of Particle-Attached and Free-Living Bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 54:217–231

Gilson L, Kuo A, Dunlap PV (1995) AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* 177:6946–6951

Gram L, Grossart H-P, Schlingloff A, Kjørboe T (2002) Possible Quorum Sensing in Marine Snow Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by *Roseobacter* Strains Isolated from Marine Snow. *Appl Environ Microbiol* 68:4111–4116

Gray KM, Garey JR (2001) The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* 147:2379–2387

Hmelo LR, Mincer TJ, Mooy BAS Van (2011) Possible influence of bacterial quorum sensing on the hydrolysis of sinking particulate organic carbon in marine environments. *Environ Microbiol Rep* 3:682–688

Hmelo L, Mooy BASV (2009) Kinetic constraints on acylated homoserine lactone-based quorum sensing in marine environments. *Aquat Microb Ecol* 54:127–133

Kievit TR de, Iglewski BH (2000) Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infect Immun* 68:4839–4849

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948

Laue BE, Jiang Y, Chhabra SR, Jacob S, Stewart GSAB, Hardman A, Downie JA, O’Gara F, Williams P (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146:2469–2480

Lerat E, Moran NA (2004) The Evolutionary History of Quorum-Sensing Systems in Bacteria. *Mol Biol Evol* 21:903–913

Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659

Loh J, Pierson EA, Pierson III LS, Stacey G, Chatterjee A (2002) Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 5:285–290

March JC, Bentley WE (2004) Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 15:495–502

Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165–199
Miller ST, Xavier KB, Campagna SR, Taga ME, Semmelhack MF, Bassler BL, Hughson FM (2004) *Salmonella typhimurium* Recognizes a Chemically Distinct Form of the Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2. *Mol Cell* 15:677–687

Milton DL, Chalker VJ, Kirke D, Hardman A, Cámara M, Williams P (2001) The LuxM Homologue VanM from *Vibrio anguillarum* Directs the Synthesis of N-(3-Hydroxyhexanoyl)homoserine Lactone and N-Hexanoylhomoserine Lactone. *J Bacteriol* 183:3537–3547

Mohamed NM, Cicirelli EM, Kan J, Chen F, Fuqua C, Hill RT (2008) Diversity and quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. *Environ Microbiol* 10:75–86

Moreno-Hagelsieb G, Latimer K (2008) Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. *Bioinformatics* 24:319–324

Nealson KH (1977) Autoinduction of bacterial luciferase. *Arch Microbiol* 112:73–79

Parsek MR, Greenberg EP (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 13:27–33

Patzelt D, Wang H, Buchholz I, Rohde M, Gröbe L, Pradella S, Neumann A, Schulz S, Heyber S, Münch K, Münch R, Jahn D, Wagner-Döbler I, Tomasch J (2013) You are what you talk: quorum sensing induces individual morphologies and cell division modes in *Dinoroseobacter shibae*. *ISME J* 7:2274–2286

Prakash T, Taylor TD (2012) Functional assignment of metagenomic data: challenges and applications. *Brief Bioinform* 13:711–727

Rivas M, Seeger M, Jedlicki E, Holmes DS (2007) Second Acyl Homoserine Lactone Production System in the Extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 73:3225–3231

Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, Wu D, Eisen JA, Hoffman JM, Remington K, Beeson K, Tran B, Smith H, Baden-Tillson H, Stewart C, Thorpe J, Freeman J, Andrews-Pfannkoch C, Venter JE, Li K, Kravitz S, Heidelberg JF, Utterback T, Rogers Y-H, Falcón LI, Souza V, Bonilla-Rosso G, Eguiarte LE, Karl DM, Sathyendranath S, Platt T, Bermingham E, Gallardo V, Tamayo-Castillo G, Ferrari MR, Strausberg RL, Nealson K, Friedman R, Frazier M, Venter JC (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol* 5:e77

Schaefer AL, Taylor TA, Beatty JT, Greenberg EP (2002) Long-Chain Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Regulation of *Rhodobacter capsulatus* Gene Transfer Agent Production. *J Bacteriol* 184:6515–6521

Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 41:463–476

Seshadri R, Kravitz SA, Smarr L, Gilna P, Frazier M (2007) CAMERA: A Community Resource for Metagenomics. *PLoS Biol* 5:e75

Smith RS, Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6:56–60

Sun S, Chen J, Li W, Altintas I, Lin A, Peltier S, Stocks K, Allen EE, Ellisman M, Grethe J, Wooley J (2011) Community cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research and Analysis: the CAMERA resource. *Nucleic Acids Res* 39:D546–D551

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739

Toulza E, Tagliabue A, Blain S, Piganeau G (2012) Analysis of the Global Ocean Sampling (GOS) Project for Trends in Iron Uptake by Surface Ocean Microbes. *PLoS ONE* 7:e30931

Uchiyama T, Miyazaki K (2009) Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr Opin Biotechnol* 20:616–622

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y-H, Smith HO (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304:66–74

Wagner-Döbler I, Thiel V, Eberl L, Allgaier M, Bodor A, Meyer S, Ebner S, Hennig A, Pukall R, Schulz S (2005) Discovery of Complex Mixtures of Novel Long-Chain Quorum Sensing Signals in Free-Living and Host-Associated Marine Alphaproteobacteria. *ChemBioChem* 6:2195–2206

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191

Waters CM, Bassler BL (2005) QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319–346

Winans SC (2002) Bacterial Esperanto. *Nat Struct Mol Biol* 9:83–84

Withers H, Swift S, Williams P (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:186–193

Xavier KB, Bassler BL (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6:191–197

Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ, Remington K, Eisen JA, Heidelberg KB, Manning G, Li W, Jaroszewski L, Cieplak P, Miller CS, Li H, Mashiyama ST, Joachimiak MP, Belle C van, Chandonia J-M, Soergel DA, Zhai Y, Natarajan K, Lee S, Raphael BJ, Bafna V, Friedman R, Brenner SE, Godzik A, Eisenberg D, Dixon JE, Taylor SS, Strausberg RL, Frazier M, Venter JC (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Expanding the Universe of Protein Families. *PLoS Biol* 5:e16

Zhang Y, Gladyshev VN (2008) Trends in Selenium Utilization in Marine Microbial World Revealed through the Analysis of the Global Ocean Sampling (GOS) Project. *PLoS Genet* 4:e1000095

Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling metagenomic database

Margot Doberva¹, Sophie Sanchez-Ferandin², Eve Toulza^{3,4}, Philippe Lebaron¹, Raphaël Lami^{1,*}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologie Marines (LBBM), Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls/Mer, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Biologie Intégrative des Organismes Marins (BIOM), Observatoire Océanologique, 66650, Banyuls/Mer, France

³UPVD Université de Perpignan, UMR 5244, IHPE, 66860 Perpignan cedex 9, France

⁴CNRS, UMR 5244, 2EI, 66860 Perpignan cedex 9, France

ABSTRACT: Quorum sensing (QS) is a cell-to-cell signalling pathway that allows bacteria to synchronize their genetic expression. It is mediated by autoinducers (AI), including (1) acyl-homoserine lactones (AHLs or AI-1), produced by *Proteobacteria* using AinS, LuxI and HdtS synthase families and (2) furanosyl-diester-borate (FDB or AI-2), produced by a large range of phylogenetically diverse bacteria and synthesized by the LuxS family. Few data have been collected about the presence and importance of QS in marine waters using culture independent methods. In this study, we examined the presence and the diversity of AI-1 and AI-2 synthases in the Global Ocean Sampling (GOS), a large metagenomic database, covering 68 stations across 3 oceans. We built 4 reference protein databases with maximal phylogenetic coverage containing all known AI synthase sequences to retrieve AI synthases sequences from the GOS metagenomes. We retrieved 29 environmental sequences affiliated to LuxI (synthesizing AI-1), 653 related to HdtS (AI-1), 31 related to LuxS (AI-2) and only one for AinS (AI-1). AI synthases sequences were found in the 3 oceans covered by the GOS cruise and spanned a large phylogenetic diversity. These data revealed a large number of new marine AI sequences, suggesting that QS based on AI-1 diffusion is a widespread mechanism in the marine environment.

KEY WORDS: Quorum sensing · Acyl-homoserine lactone synthases · Global Ocean Sampling · Environmental metagenomes

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

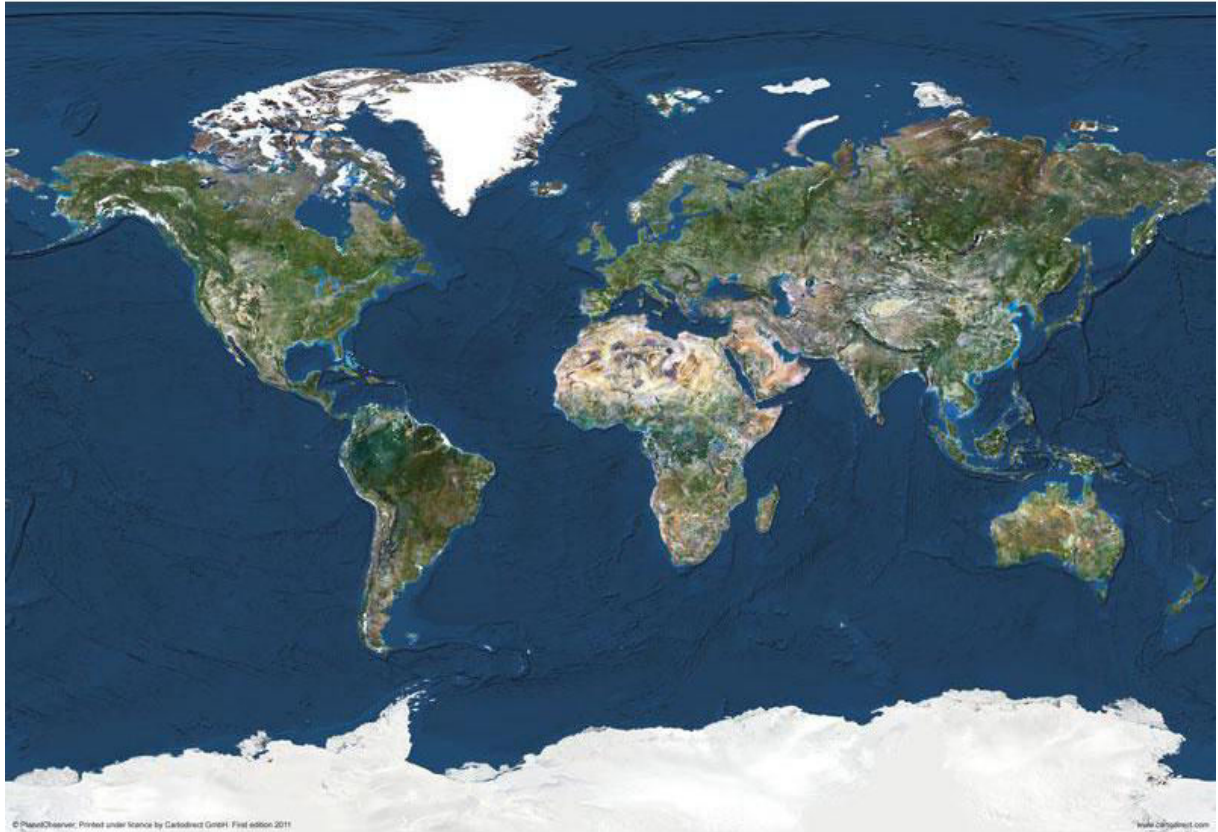
Quorum sensing (QS) is a cell-to-cell bacterial communication mechanism, allowing bacteria to sense their population density (Nealson 1977) and coordinate their gene expression levels (Bassler 1999, Fuqua & Greenberg 2002) and physiological activities (Miller & Bassler 2001). To perform QS-based communication, bacteria produce, secrete and accumulate small hormone-like molecules called autoinducers (AI) in the nearby environment (Fuqua et al. 1994). As cell density increases, the concentration of these AI increases. When a given threshold

concentration is reached, targeted bacterial partners can respond to these compounds and modify their gene expression, and thus their behaviour and phenotype (Withers et al. 2001, Bassler 2002). It has been shown that QS systems regulate and synchronize activities like biofilm production (Parsek & Greenberg 2005, Dickschat 2010), nodulation (Cha et al. 1998, Loh et al. 2002), bioluminescence (Waters & Bassler 2005), virulence factor production (Smith & Iglewski 2003) and many others (Diggle et al. 2007). The coordination of bacterial community activities conveys an ecological advantage to the population (Case et al. 2008).

*Corresponding author: raphael.lami@obs-banyuls.fr

Chapitre IV :

Discussion générale & perspectives



**Diversité, prévalence et expression du
quorum sensing basé sur les AHLs dans
l'environnement marin**

Chapitre IV : Discussion générale & perspectives : diversité, prévalence et expression du quorum sensing basé sur les AHLs dans l'environnement marin

Cette discussion se base sur l'ensemble des résultats obtenus au cours des expérimentations effectuées pour ce travail de thèse, c'est-à-dire ceux présentés dans les publications des chapitres précédents et ceux qui n'ont pas encore fait l'objet d'une publication. Cette partie vise à proposer un bilan de ces données, ainsi que les mettre en perspective. Trois questions serviront d'axes conducteurs :

- Quelle est la prévalence du QS basé sur les AHLs dans l'environnement marin ?
- Quels liens entre la diversité moléculaire de la famille des AHLs et les gènes codant les AHLs synthases ?
- Quels sont les rôles fonctionnels du QS basé sur les AHLs dans l'environnement marin ?

V-1 Quelle est la prévalence du QS basé sur les AHLs dans l'environnement marin ?

V-1-1 La présence d'AHLs chez les bactéries issues des divers écosystèmes marins

Quelques études réalisées depuis les années 2000, telles que celles de Gram et al (2002), Wagner-Dobler et al (2005) et Mohamed et al (2008) ont pu mettre en évidence la production d'AHLs par des bactéries marines isolées de différents écosystèmes marins (**Figure 35**). En effet le premier travail de ce type a pu mettre en exergue pour la première fois la production d'AHLs par quatre bactéries marines isolées de la neige marine en Mer du Nord (Gram et al. 2002). Au cours de ce travail 43 souches ont été testées dont trois souches appartenant à la famille des *Rhodobacteraceae* ou clade des *Roseobacter* (*Alpha-Proteobacteria*) et une souche du genre *Marinobacter* (*Gamma-Proteobacteria*). Les AHLs furent détectées par chromatographie sur couche mince. Ainsi la C6-HSL et la C8-HSL ont été identifiées mais toutes n'ont pas été caractérisées (Gram et al. 2002).

En 2005 une seconde étude a testé 102 souches issues également de la mer du Nord mais cette fois-ci isolées de plusieurs écosystèmes marins (Wagner-Döbler et al. 2005). En

effet les bactéries testées pour leur capacité à produire de AHLs vivaient dans leur environnement naturel en association avec des dinoflagellés, du picoplancton, des macro-algues du genre *Laminaria*, des diatomées, et vivant de manière libre dans colonne d'eau. Les 67 souches produisant des AHLs appartiennent à la classe des *Alpha-Proteobacteria* et sont issues des différents écosystèmes marins prélevés au cours de cette étude. Les AHLs ont été caractérisées à l'aide de techniques de chromatographie en phase gazeuse et de spectrométrie de masse. Les AHLs à longue chaîne ressortent majoritaires de cette étude (C14-HSL, C16-HSL, C18-HSL) mais quelques AHLs à chaîne courte ont également été mises en évidence. De plus une AHL avec une insaturation dans la chaîne latérale a été identifiée Z7-C14:1-HSL ainsi que des AHLs ayant des substitutions de type hydroxylation ou oxydation (Wagner-Döbler et al. 2005).

Une troisième étude s'est focalisée sur des souches bactériennes vivant en association avec les éponges des espèces *Mycale laxissima* et *Ircina strobilina* qui ont été échantillonnées dans la mer "key largo" en Floride, ainsi que des souches issues de la colonne d'eau environnante de ces éponges. Une vingtaine de souches étaient positives pour la production d'AHLs. Ces bactéries appartiennent aux classes d'*Alpha-* et *Gamma-Proteobacteria*. Les analyses en chromatographie liquide sur couche mince en phase inverse révèlent la production d'oxo-C12-HSL, de C10-HSL, de C8-HSL, d'oxo-C8-HSL, de C6-HSL, d'oxo-C6-HSL, et de C4-HSL par les souches appartenant aux *Alpha-Proteobacteria* alors que celles apparentées aux *Gamma-Proteobacteria* émettent préférentiellement des C4-HSL, C6-HSL et C8-HSL. Cependant comme dans l'étude de 2002 la caractérisation de l'ensemble des AHLs produites par chaque souche est probablement incomplète (Mohamed et al. 2008). La spectrométrie de masse est donc un outil incontournable pour une caractérisation précise des AHLs produites pour les différentes souches.

Ainsi, le criblage de souches issues de la collection de bactéries marines MOLA (tableau annexe 17) nous a permis de compléter les données amenées par ces études précédentes car notre criblage visait des protéobactéries issues des différents écosystèmes marins et d'origines géographiques très variées (**Figure 35**). Nous avons testé pour leur capacité à émettre des AI-1 un total de 520 souches marines issues de cette collection et réparties dans les familles taxonomiques suivantes *Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Sphingomonadaceae* et *Erythrobacteraceae*. Au total, 46 souches se sont révélées positives pour la production d'AI-1 soit environ 9% (**Tableau 8**). Parmi lesquelles, 5 nouveaux genres

jamais décrits auparavant pour la synthèse d'AI-1 ont été mis en évidence: *Croceicoccus*, *Maribius* sp, *Marinovum*, *Roseibacterium* et *Thioclava*. Ils font partie de la famille des *Rhodobacteraceae* sauf *Croceicoccus marinus* qui appartient à la famille des *Erythrobacteraceae* tout comme *Erythrobacter vulgaris* (**Tableau 8**). Dans des travaux précédents, des souches du genre *Erythrobacter* ont été décrites comme produisant des AI-1 en association avec des cyanobactéries (Van Mooy et al. 2012b) et du corail (Golberg et al. 2011). *Sulfitobacter brevis* et *Sulfitobacter dubius* sont deux espèces de *Sulfitobacter* décrites pour la première fois comme produisant des AI-1. *Celeribacter neptunius* et *Paracoccus caeni* (Schaefer et al. 2002, Williams 2007) sont également deux autres nouvelles espèces décrites pour la première fois comme émettant des AHLs grâce à notre étude. *Maribius* sp. est une souche dont le genre est très peu étudié, et seulement deux études à jour se sont intéressées à ce dernier (Choi et al. 2007, Guibert et al. 2012). Nous avons donc séquencé le premier génome de ce genre (Doberva et al. 2014a) et il comporte une seule voie orthologue de luxI/luxR. La production de nombreuses AHLs par cette souche a également été mise en évidence (Doberva et al in prep papier présenté dans ce manuscrit). *Pelagibaca bermudensis* est une souche chez laquelle seul un *luxR* a été mis en évidence dans le seul génome complet disponible (Cude & Buchan 2013), c'est donc la première fois que la synthèse d'AHLs est mise en évidence pour ce genre bactérien. Le genre *Ruegeria* a déjà été décrit pour la synthèse d'AI-1, notamment les espèces *R. lacuscaerulensis* *R. pomeroyi* dont les mécanismes de QS ont été décryptés au niveau chimique et génétique. Cependant notre étude met en évidence l'existence d'une communication par quorum chez les espèces *R. conchae*, *R. atlantica*, *R. halocynthiae* et *R. mobilis* en détectant des AI-1 produits par ces dernières. *Ruegeria mobilis* est aussi connue pour la production de TDA, dont il a été démontré qu'il pouvait également jouer un rôle d'auto-inducteur (Geng & Belas 2010, Wietz et al. 2010, Prol García et al. 2013). Nous avons également séquencé le génome complet de *Ruegeria halocynthiae* (Doberva et al. 2014b) car cette souche vit en association avec l'éponge marine *Crambe crambe*, connue en pharmacologie pour sa production de molécules actives. Le génome de *Ruegeria halocynthiae* R1/13B comporte deux voies orthologue à luxI/luxR. *Roseobacter litoralis*, *Roseovarius tolerans*, *Phaeobacter caeruleus*, *Phaeobacter gallaeciensis* et *Celeribacter baekdonensis* sont cinq espèces déjà décrites pour la production d'AI-1 autant génétiquement que chimiquement. Par ailleurs, neuf génomes de *Roseobacter*, trois de *Roseovarius*, et huit de *Phaeobacter* sont séquencés (<http://www.roseobase.org/index.html>). Toutes ces bactéries ont été isolées de différents écosystèmes marins tels que la colonne d'eau,

associées à des algues, des éponges, des lichens... (**Tableau 8**), et d'origines géographiques très variées (**Figure 35**).

La nature des AHLs produites par les souches taxonomiquement originales pour la production d'AI-1 a été caractérisée à l'aide de techniques de chimie des substances naturelles telles que la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. Ainsi la majorité des AHLs identifiées pour les différentes souches analysées sont à chaînes longues (**Tableau 8**). Par exemple *Thioclava pacifica* MOLA 703 émet les AHLs suivantes : oxo-C11:1-HSL / OH-C19-HSL / oxo-C18-HSL / OH-C18-HSL / oxo-C17:1-HSL / oxo-C20-HSL. Il est à noter que la longueur maximale de la chaîne latérale des AHLs caractérisée auparavant était de 18 carbones, cependant nos données indiquent que des AHLs avec des chaînes en C19 et C20 seraient produites par des bactéries marines (**Tableau 8**). Ces résultats sont concordants avec l'hypothèse publiée dans l'article de Zan et al (2014) : les AHLs à longue chaîne sont plus stables au pH alcalin du milieu marin qui est de 8,2. (Zan et al. 2014). En effet, en milieu marin le temps de demi-vie des AHLs à longue chaîne qui sont plus hydrophobes est plus important que celui des AHLs à chaîne courte qui sont plus hydrophiles. La production d'AHLs à longue chaîne est courante chez les *Rhodobacteraceae* (Wagner-Döbler et al. 2005).

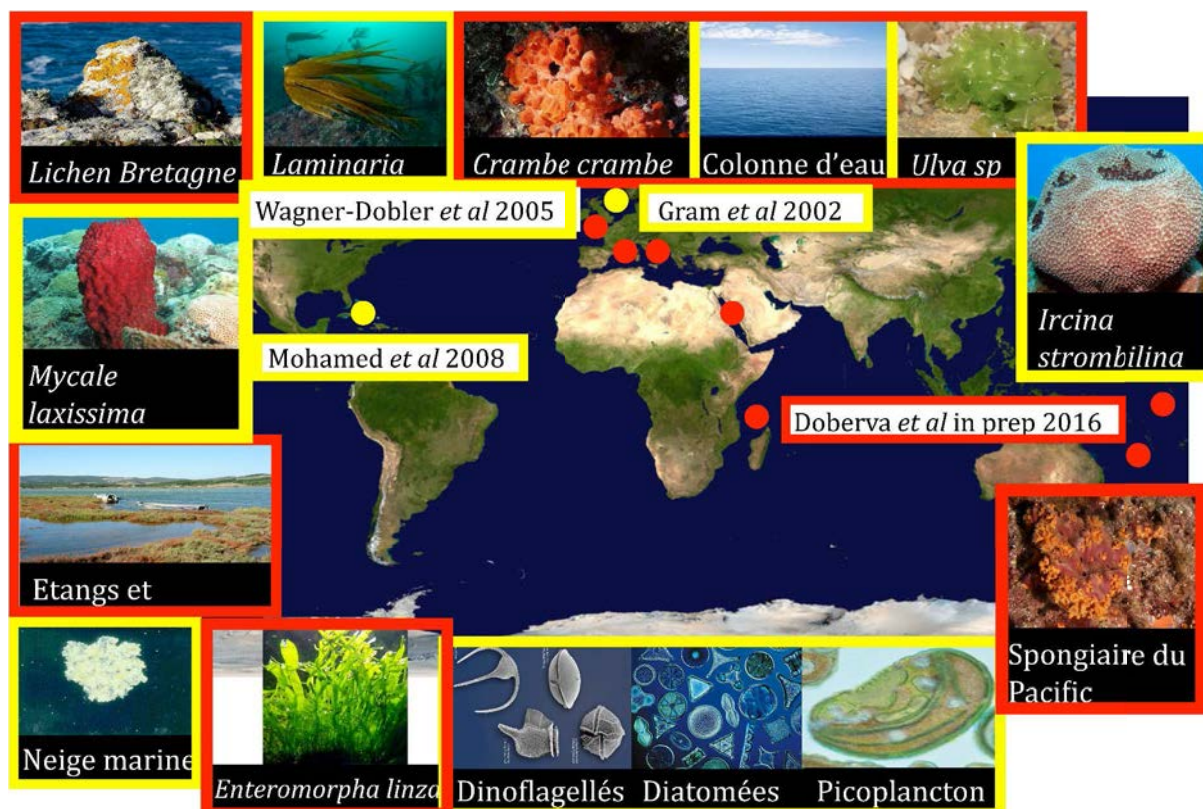


Figure 35 : Distribution biogéographique des souches bactériennes marines positives pour la production d'AI-1.

L'étude de Gram et al a été publiée en 2002 (Mer du Nord, bactéries associées à la neige marine). L'étude de Wagner-Dobler et al a été publiée en 2005 (Mer du Nord, bactéries associées à des dinoflagellés, du picoplancton, des macro-algues du genre *Laminaria*, des diatomées, et vivant dans la colonne d'eau). L'étude de Mohamed et al a été publiée en 2008 (mer "key largo", Floride, bactéries associées à des éponges). L'ensemble de ces études sont indiquées par les points jaunes. Pour les données acquises au cours de cette thèse (Doberva et al en préparation) : (différents océans, bactéries associées à des algues, des éponges, des lichens, vivant dans la colonne d'eau marine et de lagune) les origines géographiques sont indiquées par les points rouges.

Tableau 8 : Souches bactériennes issues de la collection MOLA positives pour la production d'AI-1.

Pourcentage de similarité au gène ARNr 16S, origine géographique de la souche, biosenseurs utilisés et détectant la production d'AHLs et AHLs potentielles.

<i>Erythrobacteraceae</i>							
Genre	espèce	ID	16S %	Origine géographique / milieu	F117	MT102	AHLs potentielles
<i>Erythrobacter</i>	<i>vulgaris</i>	MOLA 971	99	Associée à une éponge / Pacifique	+	+	OH-C8-HSL
<i>Croceicoccus</i>	<i>marinus</i>	C6 S3 3a	99	Colonne d'eau Baie de Banyuls (SOLA)	+	+	N.D.
<i>Vibrionaceae</i>							
<i>Vibrio</i>	<i>metschnikovii</i>	MOLA 1026	98	Lac de cratère Dziani Dzaha (MAYOTTE)	+	+	
	<i>neptunius</i>	MOLA 497	99	colonne d'eau Baie de Banyuls (SOLA)	+		
	<i>ordalii</i>	MOLA 1015	100	Etang de Bages-Sigean (Aude 11, France)	+	+	
	<i>shilonii</i>	MOLA 679	99	Associée à une éponge / Pacifique	+	+	
	<i>tubiashii</i>	MOLA 901	99	Associée à une éponge / Pacifique	+	+	
	<i>tubiashii</i>	MOLA 942	99	Associée à une éponge / Pacifique	+	+	
	<i>azureus</i>	MOLA 1228	95	Associée à un oursin de la baie de Banyuls	+	+	
	<i>azureus</i>	MOLA 1237	95	Associée à un oursin de la baie de Banyuls	+	+	
	<i>azureus</i>	MOLA 1238	95	Associée à un oursin de la baie de Banyuls	+	+	
	<i>cincinnatiensis</i>	MOLA 1630	100	CIP collection	+	+	
	<i>mediterranei</i>	MOLA 1639	100	CIP collection	+	+	
<i>Rhodobacteraceae</i>							
<i>Thioclava</i>	<i>pacifica</i>	MOLA 703	98	Associée à une éponge (Océan Pacifique Sud)	+	+	oxo-C11:1-HSL / OH-C19-HSL / oxo-C18-HSL / OH-C18-HSL / oxo-C17:1-HSL /

<i>Sulfitobacter</i>	<i>brevis</i>	MOLA 1436	99	Associée avec un lichen (Côtes d'Armor 22, france)	+	+	C8-HSL / oxo-C8-HSL
	<i>dubius</i>	MOLA 697	98	Associée à une éponge / Océan Pacifique	+	+	OH-C19-HSL / OH-C18-HSL / OH-C17-HSL / OH-C16-HSL / oxo-C15:1-HSL
<i>Roseobacter</i>	<i>littoralis</i>	DSM 6996		Associé à une macro-algue <i>Enteromorpha linza</i>	+	+	
<i>Roseovarius</i>	<i>tolérans</i>	LMdA5	98	Lagunes de LA PALME (Aude 11, France)	+	+	
<i>Roseibacterium</i>	<i>beibuensis</i>	MOLA 920	96	Associée à une éponge (Océan Pacifique SUD)	+		N.D.
<i>Phaeobacter</i>	<i>gallaeciensis</i>	MOLA 1957	100	Associé à une macro-algue <i>Ulva sp</i>	+	+	
	<i>caeruleus</i>	MOLA 878	98	Colonne d'eau Etang de Bages-Sigean (Aude 11, France)		+	
<i>Pelagibaca</i>	<i>bermudensis</i>	MOLA 614	100	Colonne d'eau Mer Adraitique Nord	+	+	oxo-C18-HSL / C16:1-HSL / OH-C17-HSL / OH-C18-HSL
<i>Marinovum</i>	<i>alginicola</i>	MOLA 610	98	Colonne d'eau Mer Adraitique Nord	+		oxo-C17:2-HSL
<i>Loktanella</i>	<i>soesokkakensis</i>	MOLA 882	96	Colonne d'eau Etang de Bages-Sigean (Aude 11, France)	+		
<i>Maribius</i>	<i>pelagius</i>	MOLA 401	95	Colonne d'eau Lagon Océan Pacifique (Nouvelle Calédonie)	+		
<i>Paracoccus</i>	<i>caeni</i>	MOLA 1390	97	Sédiments plage centrale (Baie de Banyuls, france)	+	+	OH-C18-HSL / oxo-C18-HSL
	<i>caeni</i>	MOLA 1393	96	Sédiments plage centrale (Baie de Banyuls, france)	+	+	
<i>Celeribacter</i>	<i>neptunius</i>	MOLA 130	97	Colonne d'eau Baie de Banyuls (SOLA)	+		
	<i>neptunius</i>	MOLA 85	99	Colonne d'eau Baie de Banyuls (SOLA)	+		

	<i>baekdonensis</i>	MOLA 97	95	Colonne d'eau Baie de Banyuls (SOLA)	+	+	
<i>Ruegeria</i>	<i>mobilis</i>	MOLA 1144	99	Colonne d'eau Mer rouge (côtes Egyptiennes)	+	+	OH-C14-HSL / C15-HSL
	<i>conchae</i>	MOLA 954	99	Associée à une éponge (Océan Pacifique Sud)	+	+	
	<i>conchae</i>	MOLA 908	98	Associée à une éponge (Océan Pacifique Sud)	+	+	
	<i>arenilitoris</i>	MOLA 904	98	Associée à une éponge (Océan Pacifique Sud)	+		
	<i>lacuscaerulensis</i>	MOLA 902	99	Associée à une éponge (Océan Pacifique Sud)	+	+	
	<i>conchae</i>	MOLA 898	99	Associée à une éponge (Océan Pacifique Sud)	+	+	
	<i>conchae</i>	MOLA 1160	98	Colonne d'eau Mer rouge (côtes Egyptiennes)		+	
	<i>atlantica</i>	MOLA 599	99	Colonne d'eau Mer Adraitique Nord	+	+	oxo-C14-HSL
	<i>lacuscaerulensis</i>	MOLA 903	99	Associée à une éponge (Océan Pacifique)	+	+	
	<i>atlantica</i>	RT0 11	98	Associée à une éponge de la baie de Banyuls	+	+	
<i>Ruegeria</i>	<i>halocynthiae</i>	R1/13b	99	Associée à l'éponge <i>Crambe</i> <i>crambe</i> - Baie de Banyuls	+	+	C14:1-HSL
	<i>halocynthiae</i>	R1/12c	99	Associée à l'éponge <i>Crambe</i> <i>crambe</i> - Baie de Banyuls	+	+	
	<i>halocynthiae</i>	R1/12a	99	Associée à l'éponge <i>Crambe</i> <i>crambe</i> - Baie de Banyuls	+	+	
	<i>halocynthiae</i>	R1/2a	99	Associée à l'éponge <i>Crambe</i> <i>crambe</i> - Baie de Banyuls	+	+	
	<i>halocynthiae</i>	R1/2b	99	Associée à l'éponge <i>Crambe</i> <i>crambe</i> - Baie de Banyuls	+	+	
	<i>halocynthiae</i>	R1/2c	99	Associée à l'éponge <i>Crambe</i> <i>crambe</i> - Baie de Banyuls	+	+	
	sp.	R2/4	94	Associée à l'éponge <i>Crambe</i> <i>crambe</i> - Baie de Banyuls	+	+	

V-1-2 La présence de gènes codant les AHL synthases dans l'environnement marin

Plusieurs études se sont focalisées sur la prévalence de la famille de gène *luxI* dans différents environnements marins ou autres. Une étude publiée en 2008 a inspecté sans distinction de milieu de vie, ni d'appartenance taxonomique, les 512 génomes bactériens disponibles pour la présence des gènes *luxI/luxR* (Case et al. 2008). Le résultat obtenu est que ces gènes sont présents uniquement dans le phylum des *Proteobacteria*, et que 13% des 512 génomes criblés possédaient ces gènes (soit 68 génomes). Les souches apparentées aux *Proteobacteria*, étaient au nombre de 265, et 26% de ces génomes complètement séquencés possèdent les gènes *luxI/luxR* (Case et al. 2008). En 2012, une publication a mis en évidence que 152 génomes de *Proteobacteria* sur 1403 étudiés possèdent au moins un exemplaire de gène appartenant aux familles de gènes *luxI/luxR* (Gelencsér et al. 2012). Un travail plus récent et plus ciblé sur la communauté microbienne associée au peuplier met en évidence que 18 génomes bactériens sur 39 possèdent les gènes *luxI/luxR*. Toutes ces souches sont classées dans le phylum des *Proteobacteria* (Schaefer et al. 2013). Enfin, une étude menée sur la famille des *Rhodobacteraceae* a montré que 49 génomes sur 59 possèdent au moins un représentant de la famille de gène *luxI* (Zan et al. 2014). La mise en évidence des gènes *luxI/luxR* dans de nombreux génomes de bactéries issues d'environnement divers indique donc que le mécanisme de quorum sensing basé sur les AHLs est présent dans le milieu naturel. Des résultats similaires sont obtenus pour les AI-2. Les AI-2 synthases sont codées par la famille de gène *luxS*. Ainsi, le travail Sun et ses collaborateurs publié en 2004 met en exergue que 51 des 138 génomes complètement séquencés possèdent un gène de la famille des *luxS* (**Figure 11**). De plus ces 51 génomes sont répartis entre les classes bactériennes suivantes : *Gamma-Proteobacteria*, *Beta-Proteobacteria*, *Epsilon-Proteobacteria* et *Firmicutes* (Sun et al. 2004). L'ensemble de ces résultats sont établis à partir de souches cultivées. En ce qui concerne les familles de gènes codant les AHL synthases *ainS* et *hdtS* aucune étude de ce type n'est actuellement disponible. Ceci peut s'expliquer par la présence de la famille *ainS* uniquement chez les *Vibrionaceae* (Gilson et al. 1995, Milton et al. 2001, Milton 2006) et la double fonctionnalité du gène *hdtS* (Laue et al. 2000, Cullinane et al. 2005) qui nécessite des analyses fonctionnelles en plus des analyses génétiques.

Cependant ce type d'étude est basé sur la culture des souches bactériennes étudiées, et il a été estimé que seulement 1% des bactéries sont cultivables (Amann et al. 1995). L'utilisation de méthodes alternatives est donc nécessaire pour accéder à l'importance réelle des gènes du QS chez les bactéries de l'environnement. L'exploration du métagénome du GOS

nous a donc permis de nous affranchir des méthodes basées sur la culture des bactéries. Des séquences issues de ce métagénome marin ont pu être apparentées aux 3 familles de gènes codant les AI-1 synthases AinS (1 séquence), HdtS (653 séquences) et LuxI (29 séquences) ainsi qu'à la famille de gènes codant les AI-2 synthases LuxS (31 séquences). Parmi ces séquences métagénomiques certaines sont affiliées des souches déjà caractérisées, et d'autres non. Cette observation suggère une diversité de séquences apparentées aux familles LuxI, HdtS et LuxS inconnue jusqu'alors et qui appartient probablement à des bactéries non cultivables. La répartition géographique de ces séquences est ubiquiste, car des séquences affiliées aux familles luxS, luxI et hdtS sont retrouvées dans les différents océans couverts par l'expédition du GOS.

La totalité des séquences métagénomiques affiliées à la famille de gènes des luxI sont apparentées à la classe des *Alpha-Proteobacteria* et les deux tiers à l'ordre des *Rhodobacterales* dont font partie les *Rhodobacteraceae* (Doberva et al. 2015). Nos données vont donc dans le même sens que celles obtenues par Zan et ses collaborateurs (Zan et al. 2014), puisque les *Rhodobacteraceae* ou clade des *Roseobacter* sont des bactéries prépondérantes dans l'océan où elles représentent près de 20% de la communauté cotière et 15% de l'hauturière (Buchan et al. 2005). De plus le séquençage complet des deux génomes de *Rhodobacteraceae* *Maribius* sp. MOLA 401 et *Ruegeria halocynthiae* R1/13B que nous avons réalisé et la présence d'orthologues des gènes luxI/luxR dans ces génomes viennent encore renforcer l'importance du mécanisme de quorum sensing basé sur les AI-1 chez les bactéries appartenant à cette famille taxonomique.

L'affiliation taxonomique des séquences métagénomiques associées à la famille luxS est très large. En effet, elle va des *Vibrionales* aux *Deinococcales* en passant par les *Chromatiales*, ce qui à nouveau vient corroborer les données publiées en 2004 par Sun et ses collaborateurs (Sun et al. 2004). Les séquences métagénomiques affiliées à la famille de gènes des hdtS sont apparentées au phylum des *Proteobacteria*. De nombreuses séquences sont apparentées au groupe des SAR11 (Morris et al. 2002) et des SAR86 (Dupont et al. 2012) ainsi qu'aux *Rhodobacterales* (Buchan et al. 2005) qui sont très abondants dans l'environnement marin. Cependant, le problème de la double fonctionnalité de l'enzyme codée par le gène hdtS nous amène à nous interroger sur la capacité de synthèse d'AHLs par les bactéries possédant cette séquence. Il sera donc nécessaire de passer par des expériences

d'expression en système hétérologue pour vérifier si la production d'AHLs peut être liée au gène *hdtS*.

Au vue de la faible profondeur de séquençage effectué pour le GOS, notre étude sous estime probablement le nombre de séquences affiliées aux familles de gènes *ainS*, *hdtS*, *luxI* et *luxS*. L'exploration d'autres métagénomes plus récents tel que celui de TARA OCEAN permettrait de valider les données acquises au cours de notre étude et peut-être de les compléter. TARA OCEAN comporte un plus grand nombre d'échantillons (35 000), une couverture de séquençage plus importante, et une plus vaste zone géographique échantillonnée (210 stations), avec une plus grande diversité d'écosystèmes marins (ten Hoopen et al. 2015).

V-1-3 L'expression des gènes codant les AHL synthèses dans l'environnement marin

Les limites techniques actuelles ne permettent pas d'avoir accès à un métabolome total pour un environnement donné (Goulitquer et al. 2012). Pour savoir si les gènes d'intérêt *ainS*, *hdtS*, *luxI* et *luxS* sont exprimés et si les AI-1 et AI-2 sont synthétisés dans l'environnement marin, nous avons criblé le métagénome et le métatranscriptome associé, obtenu à partir de la station d'observation marine de Plymouth en Angleterre (Western Channel Observatory Microbial Metagenomic Study <http://www.westernchannelobservatory.org.uk/>). Cette banque de données contient au total 2 199 020 480 paires de bases soit 7 354 754 séquences. Les résultats obtenus suite à l'exploration de cette base de données ont confirmé ceux obtenus lors de l'exploration de la banque de données du GOS. En effet seize séquences métagénomiques similaires au LuxI sont apparentées majoritairement à la famille de *Rhodobacteraceae* ou clade des Roseobacter (**Tableau 9**) et une séquence métatranscriptomique est apparentée au *luxI* de *Bradyrhizobium*. Une séquence apparentée au LuxM de *Vibrio* a été trouvée ainsi que trois séquences affiliées à la famille de gènes LuxS, aux genres *Vibrio* et *Psychromonas*. Enfin, une cinquantaine de séquences issues de ce métagénome ont pu être liées à la famille HdtS et sont réparties dans les groupes SAR86, *Pseudomonas*, *Marinomonas*, *Luminiphilus*... (**Tableau 9**). Ces données préliminaires restent trop partielles pour conclure sur l'existence de patterns d'expression du QS en milieu marin. Cependant le faible nombre de séquences trouvées dans ces métatranscriptomes suggère une expression fortement régulée de ces processus par les bactéries.

Tableau 9 : Nombre de séquences apparentées aux familles de gènes *ainS*, *hdtS*, *luxI* et *luxS* issues du métagénome et du métatranscriptome associé de la station d'observation de Plymouth.

Données	<i>ainS</i>	<i>luxI</i>	<i>hdtS</i>	<i>luxS</i>
Méta génom	1 séquence <i>Vibrio</i>	2 séquences <i>Rhizobiales</i> 6 séquences <i>Rhodobacteraceae</i> 2 séquences <i>Caenispirillum</i> 5 séquences <i>Roseobacter</i> 1 séquence <i>Salipiger</i>	21 séquences <i>SAR 86</i> 9 séquences <i>Methylophilales</i> 10 séquences <i>Pseudomonas</i> 2 séquences <i>Thiocapsa marina</i> 3 séquences <i>Luminiphilus</i> 2 séquences <i>Hahella</i> , 1 séquence <i>Candidatus Ruthia</i> 1 séquence <i>Halomonas</i> 1 séquence <i>Nitrosococcus</i> 1 séquence <i>Marinomonas</i> 1 séquence <i>Teredinibacter</i>	2 séquences <i>Vibrio</i> 1 séquence <i>Psychromonas</i>
Total	1 séquence au total	16 séquences au total	52 séquences au total	3 séquences au total
Méta transcriptome		1 séquence métatranscriptomique <i>luxI bradyrhizobium</i>		

Suite aux résultats obtenus sur la famille d'AHLs synthases HdtS après exploration du métagénome du GOS, et vu le grand nombre de séquences affiliées au groupe bactérien SAR11 très abondant dans l'océan (Morris et al. 2002), nous avons tenté de vérifier si une souche représentante de ce groupe bactérien produisait des AHLs. Nous avons donc réalisé le criblage du surnageant d'une culture de SAR11. La souche utilisée est *Pelagibacter ubique*, qui nous a été fournie par le laboratoire de David L Kirchman aux USA, avec l'aimable autorisation de S. J Giovanoni pour travailler dessus. Ce criblage a été réalisé à l'aide des souches rapportrices pour les AI-1 (*Pseudomonas putida* F117 et *Escherichia coli* MT102), mais les résultats obtenus ont été négatifs, ce qui peut s'expliquer par une densité de cellules insuffisante dans la culture (**Figure 36**). En effet, cette souche bactérienne est très difficile à cultiver (Rappé et al. 2002), sa croissance est lente et la culture en conditions de laboratoire atteint en général une densité cellulaire bien inférieure à celle nécessaire pour la mise en place du mécanisme de quorum sensing. L'ensemble de ces données montre l'importance de comprendre les patterns d'expression du QS en milieu marin, le rôle des facteurs environnementaux, de l'état physiologique des cellules et de leurs interactions.

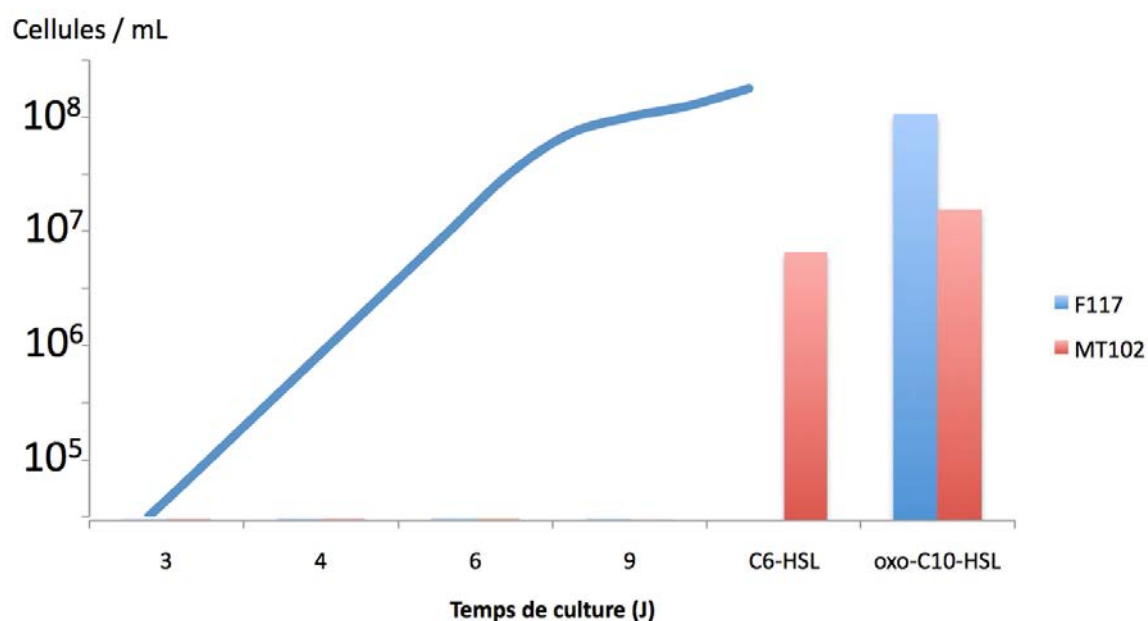


Figure 36 : Courbe de croissance et test de la production d'AI-1 par SAR 11 *Pelagibacter ubique*.

Les tests de production d'AI-1 ont été réalisés à l'aide des deux souches rapportrices *Pseudomonas putida* F117 (bleu) et *Escherichia coli* MT102 (rose), et ont été réalisés à différents temps d'incubation tout au long de la courbe de croissance de SAR 11 *Pelagibacter ubique*. 3-4 jours de culture correspondent à la phase exponentielle de culture, 6 jours de cultures correspondent à la fin de la phase exponentielle et 9 jours correspondent au plateau de croissance. C6-HSL et oxo-C10-HSL sont les témoins positifs.

V-2 Quels liens entre la diversité moléculaire de la famille des AHLs et celle des gènes codant les AHL synthases ?

V-2-1 La famille de gènes codant les AHL synthase LuxI

Le séquençage du génome complet de la souche bactérienne marine *Maribius sp.* MOLA 401 a permis de mettre en évidence la présence d'un gène de la famille *luxI* ainsi que d'un gène de la famille *hdtS* dans ce même génome. Le dénombrement et la caractérisation chimique des AHLs produites par *Maribius sp.* MOLA 401 mettent en exergue une vingtaine d'AHLs dont la majorité sont à longue chaîne. De plus, des AHLs présentant des structures nouvelles et notamment une hyper hydroxylation de la chaîne aliphatique sont aussi synthétisées par cette bactérie marine oligotrophe originaire du lagon de Nouvelle Calédonie. De ces résultats ressort un paradoxe : comment avec un ou deux gène(s) codant donc une ou deux enzyme(s) dites AHL synthase cette bactérie peut-elle synthétiser autant d'AHL ? Beaucoup de bactéries synthétisent plusieurs AHLs (tableau annexe 16) et n'ont dans leur génome qu'un ou deux gènes de la famille *luxI* et parfois un de la famille *hdtS*. Par exemple, plusieurs souches du genre *Halomonas* synthétisent des suites d'AHLs C12-HSL / C8-HSL / C6-HSL / C4-HSL alors qu'elles ne possèdent dans leur génome qu'un seul gène de la famille des *luxI* nommé *hanI* ou *halI* selon l'espèce (Llamas et al. 2005, Tahrioui et al. 2011). La bactérie *Acidithiobacillus ferrooxidans* synthétise OH-C8-HSL / OH-C10-HSL / OH-C12-HSL / OH-C16-HSL / C12-HSL / oxo-C12-HSL, cet ensemble d'HSLs serait dû à l'expression du gène *afel* apparenté à la famille des *luxI* (Farah et al. 2005, Wenbin et al. 2011). La souche bactérienne *Silicibacter-Ruegeria* émet oxo-C14-HSL / oxo-C16-HSL / OH-C12-HSL ainsi que OH-C14-HSL / OH-C14:1-HSL / OH-C13-HSL, et son génome code pour trois gènes de la famille des *luxI* : *ssaI*, *ssbI* et *sscI*. L'AHL synthase produisant les trois premières AHLs est codée par *ssaI*, les deux autres gènes codent l'AHL synthase synthétisant les trois autres AHLs (Zan et al. 2011, 2012).

V-2-2 La famille de gènes codant les AHL synthases HdtS

Pour essayer de savoir si le gène *hdtS* code également une AHL synthase chez les bactéries marines, nous sommes en train de réaliser, en collaboration avec une ingénieure de recherche de la station biologique de Roscoff, une expression hétérologue de ce gène à partir

des séquences du gène *hdtS* de quatre bactéries marines dont le génome a été complètement séquencé :

- *Maribius* sp. MOLA 401 qui provient du lagon de nouvelle Calédonie (Doberva et al. 2014a),
- *Ruegeria halocynthiae* R1/13B qui est issue d'une éponge de Méditerranée *Crambe crambe* (Doberva et al. 2014b),
- *Pseudomonas* sp. MOLA 455 isolée de la colonne d'eau de la station d'observation SOLA (Baie de Banyuls) en mer Méditerranée (Courties et al. 2014),
- *Hydrogenophaga* sp MOLA 814 provenant de la colonne d'eau de la mer de Beaufort dans l'océan Arctique (Courties et al. 2013).

Une fois le gène *hdtS* de chacune des quatre souches marines cloné dans la bactérie porteuse *Escherichia coli* JM109, la capacité de ces gènes à coder une AHL synthase fonctionnelle sera testée avec les souches rapportrices de AI-1 *Pseudomonas putida* F117 et *Escherichia coli* MT102. Si le test est positif, des extractions chimiques seront réalisées afin de caractériser les AHLs grâce aux techniques de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse. Ce type d'expérimentation a été réalisé deux fois auparavant avec le gène *hdtS* de la bactérie du sol *Pseudomonas fluorescens* (Laue et al. 2000) et le gène *act*, un orthologue de *hdtS*, de la bactérie isolée de mines acides *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Rivas et al. 2007). L'expression hétérologue du gène *hdtS* de *Pseudomonas fluorescens* a permis la synthèse des AHLs (tableau annexe 16) C6-HSL / C10-HSL / OH-C14:1-HSL (Laue et al. 2000), et celle de *act* provenant d' *Acidithiobacillus ferrooxidans* a engendré la production de C14-HSL / oxo-C14-HSL / OH-C14-HSL / OH-C14:1-HSL (Rivas et al. 2007). De plus, la souche *Nitrosomonas europea* dont le génome est entièrement séquencé ne présente aucun gène appartenant à la famille des *luxI* ou des *ainS*, et produit pourtant la série d'AHL C6-HSL / C8-HSL / C10-HSL (tableau annexe 16). Ces données suggèrent que la synthèse de ces AI-1 est due à une AHL synthase codée par un gène de la famille *hdtS*, cependant ce dernier n'a pas été isolé et cloné (Burton et al. 2005).

V-2-3 Lien gène codant l'AHL synthase et AHLs synthétisées

Il n'y a donc pas de lien clair entre gène codant, enzyme exprimée et molécule produite au cours du processus de quorum sensing basé sur les AHLs. Les AHLs synthases sont des enzymes de la famille des acyltransférases qui catalysent la liaison amide de l'AHL en liant la chaîne aliphatique (partie variable) et l'homosérine lactone (partie invariable). Certaines

AHLs synthases sont peu sélectives en ce qui concerne la chaîne acyle (Gould et al. 2004). Il n'est donc pas étonnant que des AHLs puissent être produites par des acyltransférases codées par un gène de la famille *hdtS* qui ont une double fonctionnalité. On constate également des suites d'AHLs comme chez *Acidithiobacillus ferrooxidans* qui synthétise OH-C16-HSL / OH-C12-HSL / OH-C10-HSL / OH-C8-HSL (Farah et al. 2005, Wenbin et al. 2011). Dans le cas des AHLs hyper hydroxylées produites par *Maribius sp.* MOLA 401 les hydroxylations pourraient être réalisées avant la synthèse de l'AHL ou après. Il est possible que l'enzyme P450 soit responsable de ces hydroxylations supplémentaires nécessaires à l'abaissement de la polarité des chaînes acyles longues qui sont hydrophobes (Chowdhary et al. 2007). L'hyperhydroxylation de la chaîne acyle des AHLs de *Maribius sp.* MOLA 401 favoriserait aussi leur sortie de la cellule bactérienne vers le milieu marin. L'environnement marin influencerait donc le type d'AHLs produit par les bactéries vivants dans ces habitats.

V-3 Quels sont les rôles fonctionnels des AHLs dans l'environnement marin ?

V-3-1 Diversité potentielle des fonctions des AHLs

Les AHLs émises par la bactérie marine *Maribius sp.* MOLA 401 sont nombreuses et certaines ont des structures nouvelles. Les AHLs sont décrites comme des molécules permettant la synchronisation et la coopération des cellules bactériennes d'une même communauté. Cependant, certains AI-1 ou AHLs sont connus pour avoir d'autres activités telles que la chélation du fer ou des activités antibiotiques (Kaufmann et al. 2005) (Schertzer et al. 2009). En effet, la AHL N-(3-oxo-decanoyl)-L-homoserine lactone ou 3-oxo-C12-AHL et le produit de sa dégradation 3-(1-hydroxydecylidene)-5-(2-hydroxyethyl)pyrrolidine-2,4-dione ont des propriétés antibiotiques contre les bactéries de type Gram positif (Kaufmann et al. 2005). De plus, le 3-(1-hydroxydecylidene)-5-(2-hydroxyethyl)pyrrolidine-2,4-dione aurait une propriété additionnelle, celle de lier le fer (sidérophore) (Kaufmann et al. 2005). La bactérie marine *Mesorhizobium sp.* produit la 5-cis-3-oxo-C12-HSL qui a aussi des propriétés antibactérienne et cytotoxique (Krick et al. 2007). On peut donc légitimement se poser la question si toutes les AHLs produites par *Maribius sp.* MOLA 401 servent uniquement de support au mécanisme de quorum sensing. Cependant la présence d'un gène codant un récepteur type luxR dans le génome de cette bactérie tend à compléter l'hypothèse d'un rôle de communication de ces molécules.

V-3-2 Suivi environnemental de l'expression du gène *luxI* de *Roseobacter*

La présence de bactéries utilisant le mécanisme de quorum sensing basé sur les AI-1 est donc ubiquiste dans l'environnement. Mais les facteurs environnementaux influençant la mise en place de ce mécanisme qui n'est pas constitutif, sont inconnus. Dans le but de vérifier l'existence de corrélation entre la variation des paramètres environnementaux biotiques (phytoplancton) et abiotiques (température, salinité) et l'expression du quorum sensing basé sur les AI-1, une quarantaine d'amorces PCR visant plusieurs groupes de *Roseobacter* et *Vibrio* ont été dessinées et testées sur des extraits d'ADN issus de cultures de souches pures ainsi que sur des extraits d'ADN environnementaux. Ce travail a abouti à la mise au point de deux jeux d'amorces PCR : l'un visant le genre *Vibrio* (forward 5' ACGTTTGCACTGGGAGC 3' et reverse 5' GCGCGTGATGATAGAGCGA 3') et l'autre ciblant le genre *Roseobacter* (forward 5' CTGCGCGATTCCATGTTCC 3' et reverse 5' CAGATCAGCGGGCTGGTAAT 3'). Les séquences obtenues après amplification de l'ADN de souches pures (amorces *Vibrio* et *Roseobacter*) et de l'ADN environnemental (amorces *Roseobacter*) ont été directement séquencés, et ont permis de valider les amorces. L'ADN environnemental est issu d'un échantillonnage effectué sur le site de l'étang de Canet dont les coordonnées GPS sont 42°39'54,7"N 3°01'40,1"E. Des échantillons d'eau ont été prélevés et filtrés successivement sur des filtres de 20µm, puis 3µm puis 0,8µm et enfin 0,2µm, ce qui permet de séparer les différents organismes vivant dans la colonne d'eau. Le zooplancton est retenu par le filtre à 20 µm, le phytoplancton par le filtre à 3µm, les particules telles que la neige marine par le filtre à 0,8µm et enfin les bactéries vivant de manière libre par le filtre à 0,2µm. Les différents paramètres environnementaux tels que la température, le pH, la salinité, la chlorophylle ont été mesurés en parallèle de l'échantillonnage d'eau. Les acides nucléiques ont ensuite été extraits des quatre types de filtres différents. Des amplifications PCR puis RT-Q-PCR avec les amorces visant le genre *Roseobacter* ont été effectuées en duplicat sur ces différents extraits d'ADN (Y. Ferandin communication personnelle) (**Figure 37**).

Ainsi on constate que le *luxI* de *Roseobacter* est présent et exprimé dans les fractions 3µm et 20µm. Les bactéries vivant en association avec le zooplancton et le phytoplancton seraient donc en densité cellulaire suffisante pour exprimer le mécanisme de quorum sensing. Maintenant que la mise au point est terminée les amplifications PCR et surtout RT-Q-PCR (**Figure 37**) vont pouvoir être réalisées sur une série temporelle afin de vérifier si les paramètres environnementaux mesurés ont une influence sur l'expression du mécanisme de

quorum sensing basé sur les AI-1. Ces amorces vont maintenant être utilisées pour suivre l'expression du quorum sensing basé sur les AHLs au cours d'une efflorescence phytoplanctonique dans la lagune de Thau, France. C'est la première fois qu'une étude de ce type est menée *in situ*.

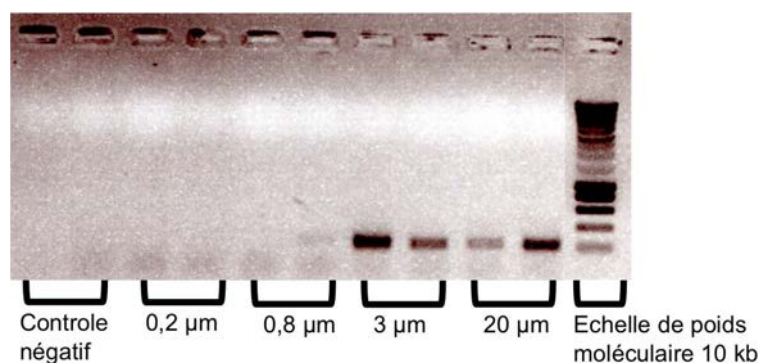


Figure 37 : Photographie du gel de migration des produits RT-Q-PCR amplifiés avec les amorces ciblant le *luxI* de *Roseobacter*.

Toutes les réactions d'amplification ont été faites en duplicat. Contrôle négatif = pas d'ADN. 0,2µm = ADN environnemental extrait à partir d'un filtre 0,2µm. 0,8µm = ADN environnemental extrait à partir d'un filtre 0,8µm. 3µm = ADN environnemental extrait à partir d'un filtre 3µm. 20µm = ADN environnemental extrait à partir d'un filtre 20µm.

V-3-3 Extinction du gène *luxI* de *Maribius sp* : trouver le(s) phénotype(s) régulé(s)

Le quorum sensing basé sur les AI-1 dans l'environnement marin est connu pour réguler l'expression de plusieurs activités bactériennes que nous avons détaillées dans l'introduction:

- Par exemple chez les bactéries marines appartenant au genre *Vibrio*, ce mécanisme régule l'expression de facteurs de virulence, et ceci a été prouvé par mutation d'un des gènes impliqués dans le mécanisme de quorum sensing (Kovacikova & Skorupski 2002).
- La mobilité de la bactérie *Ruegeria* vivant en association avec une éponge est aussi synchronisée par QS, ce qui a été démontré avec des techniques de mutation des gènes orthologues du *luxI* que possède cette bactérie (Zan et al. 2015b).
- Le transfert d'ADN est également géré par le mécanisme de QS basé sur les AI-1 chez la bactérie marine *Rhodobacter capsulatus* ce qui a été testé en mutant l'orthologue de *luxI*

présent dans le génome la souche bactérienne *Rhodobacter capsulatus* afin de l'inactiver (Schaefer et al. 2002).

- La formation de biofilms a été mise en évidence chez des bactéries marines de la famille des *Rhodobacteraceae* comme le genre *Ruegeria*. La mutation des gènes orthologues de *luxI* et *luxR* chez cette souche influence la formation de biofilms (Zan et al. 2014).

- La bactérie marine *Phaeobacter gallaeciensis* qui fait partie de la famille des *Rhodobacteraceae* régule la production d'acide tropodithiétique ou TDA grâce au mécanisme de QS basé sur les AI-1, ce qui a été prouvé en mutant les gènes orthologues de *luxI* et *luxR* chez cette souche (Berger et al. 2011).

- La morphologie des cellules de *Dinoroseobacter shibae* une bactérie marine membre de la famille des *Rhodobacteraceae*, et vivant en association avec un dinoflagellé (algue unicellulaire), est sous l'influence des AHLs. En effet, lorsque la bactérie ne peut plus produire d'AHL sa morphologie est constante alors que lorsqu'elle en produit elle peut prendre différentes formes en fonction de son environnement, ce qui a été vérifié en inactivant l'orthologue du *luxI* chez cette bactérie (Patzelt et al. 2013).

- La bioluminescence bactérienne a été mise en évidence chez les bactéries membres de la famille des *Vibrionaceae* et notamment chez *Vibrio harveyi*. Elle est contrôlée par le QS basé sur les AI-1, AI-2 et le CAI et ceci a été prouvé en mutant les gènes *luxI*, *luxS* et *cqsA* (Henke & Bassler 2004).

Certains phénotypes régulés par le QS basé sur les AI-1 comme la nodulation (rhizomes des herbiers de posidonie) et la fructification restent non explorés en milieu marin. Dans le cas de la souche bactérienne *Maribius sp* MOLA 401, l'inactivation du gène *luxI* permettrait de savoir d'une part si le potentiel gène *hdtS* de celle-ci est actif pour la production d'AHLs, et d'autre part de déterminer quel(s) phénotype(s) bactérien(s) est (sont) régulé(s) par le QS basé sur les AI-1 chez cette bactérie marine issue d'un écosystème pélagique oligotrophe.

La communication cellule à cellule basée sur la densité cellulaire chez les bactéries, mais aussi chez les autres micro-organismes tels que les archées et les eucaryotes unicellulaires permet la coopération et la synchronisation des individus au sein de leur communauté. La combinaison des techniques d'analyses permet l'élucidation du mécanisme de quorum sensing. Les résultats obtenus tout au long de cette thèse participent à la

compréhension du système de quorum sensing dans l'environnement marin. Néanmoins ce mécanisme reste peu étudié dans l'environnement naturel, mais mes données suggèrent une grande importance des processus de QS dans les environnements marins.

Bibliographie générale

A

Abbamondi GR, De Rosa S, Iodice C, Tommonaro G (2014) Cyclic dipeptides produced by marine sponge-associated bacteria as quorum sensing signals. *Nat Prod Commun* 9:229–232

Ahlgren NA, Harwood CS, Schaefer AL, Giraud E, Greenberg EP (2011) Aryl-homoserine lactone quorum sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *Proc Natl Acad Sci* 108:7183–7188

Alberghini S, Polone E, Corich V, Carlot M, Seno F, Trovato A, Squartini A (2009) Consequences of relative cellular positioning on quorum sensing and bacterial cell-to-cell communication. *FEMS Microbiol Lett* 292:149–161

Albuquerque P, Casadevall A (2012) Quorum sensing in fungi – a review. *Med Mycol* 50:337–345

Allredge AL, Silver MW (1988) Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Prog Oceanogr* 20:41–82

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143–169

Amin SA, Hmelo LR, Tol HM van, Durham BP, Carlson LT, Heal KR, Morales RL, Berthiaume CT, Parker MS, Djunaedi B, Ingalls AE, Parsek MR, Moran MA, Armbrust EV (2015) Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature* 522:98–101

Amin SA, Parker MS, Armbrust EV (2012) Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 76:667–684

Anand TP, Bhat AW, Shouche YS, Roy U, Siddharth J, Sarma SP (2006) Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiol Res* 161:252–262

Andersen JB, Heydorn A, Hentzer M, Eberl L, Geisenberger O, Christensen BB, Molin S, Givskov M (2001) gfp-Based N-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Appl Environ Microbiol* 67:575–585

Apprill A, Robbins J, Eren AM, Pack AA, Reveillaud J, Mattila D, Moore M, Niemeyer M, Moore KMT, Mincer TJ (2014) Humpback Whale Populations Share a Core Skin Bacterial Community: Towards a Health Index for Marine Mammals? *PLoS ONE* 9:e90785

Atkinson S, Chang C-Y, Sockett RE, Cámara M, Williams P (2006) Quorum Sensing in

Yersinia enterocolitica Controls Swimming and Swarming Motility. *J Bacteriol* 188:1451–1461

Atkinson S, Throup JP, Stewart GSAB, Williams P (1999) A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol* 33:1267–1277

Atkinson S, Williams P (2009) Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* 6:959–978

Azam, F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyerreil LA, Thingstad F. (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology-Progress Series*. 10:257-263.

Azam F, Malfatti F (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol* 5:782–791

B

Bacchetti De Gregoris T, Khandeparker L, Anil AC, Mesbahi E, Burgess JG, Clare AS (2012) Characterisation of the bacteria associated with barnacle, *Balanus amphitrite*, shell and their role in gregarious settlement of cypris larvae. *J Exp Mar Biol Ecol* 413:7–12

Bachofen R, Schenk A (1998) Quorum sensing autoinducers: Do they play a role in natural microbial habitats? *Microbiol Res* 153:61–63

Bainton NJ, Stead P, Chhabra SR, Bycroft BW, Salmond GP, Stewart GS, Williams P (1992) N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* 288:997–1004

Barash I, Manulis-Sasson S (2009) Recent Evolution of Bacterial Pathogens: The Gall-Forming *Pantoea agglomerans* Case. *Annu Rev Phytopathol* 47:133–152

Bassler BL (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2:582–587

Bassler BL (2002) Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell* 109:421–424

Bassler BL, Greenberg EP, Stevens AM (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 179:4043–4045

Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* 9:773–786

Beman JM, Bertics VJ, Braunschweiler T, Wilson JM (2012) Quantification of ammonia oxidation rates and the distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in marine sediment depth profiles from Catalina Island, California. *Front Microbiol* 3

Berger M, Neumann A, Schulz S, Simon M, Brinkhoff T (2011) Tropodithietic Acid Production in *Phaeobacter gallaeciensis* Is Regulated by N-Acyl Homoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing. *J Bacteriol* 193:6576–6585

Bertrand J-C, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P (2011) *Ecologie Microbienne : Microbiologie des milieux naturels anthropisés*.

Biswa P, Doble M (2013) Production of acylated homoserine lactone by gram-positive bacteria isolated from marine water. *FEMS Microbiol Lett* 343:34–41

Bodman SB von, Majerczak DR, Coplin DL (1998) A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci* 95:7687–7692

Bodman SB von, Bauer WD, Coplin DL (2003) Quorum Sensing in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 41:455–482

Bodor A, Elxnat B, Thiel V, Schulz S, Wagner-Dobler I (2008) Potential for luxS related signalling in marine bacteria and production of autoinducer-2 in the genus *Shewanella*. *BMC Microbiol* 8:13

Bogomolni AL, Gast RJ, Ellis JC, Dennett M, Pugliares KR, Lentell BJ, Moore MJ (2008) Victims or vectors: a survey of marine vertebrate zoonoses from coastal waters of the Northwest Atlantic. *Dis Aquat Organ* 81:13–38

Boyer M, Bally R, Perrotto S, Chaintreuil C, Wisniewski-Dyé F (2008) A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*. *Res Microbiol* 159:699–708

Boyer M, Wisniewski-Dyé F (2009) Cell–cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol* 70:1–19

Brackman G, Coenye T (2015) Inhibition of Quorum Sensing in *Staphylococcus* spp. *Curr Pharm Des* 21:2101–2108

Bredenbruch F, Geffers R, Nimtz M, Buer J, Häussler S (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ Microbiol* 8:1318–1329

Brenner K, You L, Arnold FH (2008) Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol* 26:483–489

Bruhn JB, Christensen AB, Flodgaard LR, Nielsen KF, Larsen TO, Givskov M, Gram L (2004) Presence of Acylated Homoserine Lactones (AHLs) and AHL-Producing Bacteria in Meat and Potential Role of AHL in Spoilage of Meat. *Appl Environ Microbiol* 70:4293–4302
Buchan A, González JM, Moran MA (2005) Overview of the Marine *Roseobacter* Lineage. *Appl Environ Microbiol* 71:5665–5677

Buchan A, LeCleir GR, Gulvik CA, González JM (2014) Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* 12:686–698
Burkhardt BG (2013) Remineralization of marine particulate organic matter.

Burton EO, Read HW, Pellitteri MC, Hickey WJ (2005) Identification of Acyl-Homoserine Lactone Signal Molecules Produced by *Nitrosomonas europaea* Strain Schmidt. *Appl Environ Microbiol* 71:4906–4909

Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ (2012) Enterococci in the Environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:685–706

Campbell J, Lin Q, Geske GD, Blackwell HE (2009) New and Unexpected Insights into the Modulation of LuxR-Type Quorum Sensing by Cyclic Dipeptides. *ACS Chem Biol* 4:1051–1059

C

Carman KR, Dobbs FC (1997) Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. *Microsc Res Tech* 37:116–135

Carr SA, Vogel SW, Dunbar RB, Brandes J, Spear JR, Levy R, Naish TR, Powell RD, Wakeham SG, Mandernack KW (2013) Bacterial abundance and composition in marine sediments beneath the Ross Ice Shelf, Antarctica. *Geobiology* 11:377–395

Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl Environ Microbiol* 73:278–288

Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S (2008) AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* 2:345–349

Cha C, Gao P, Chen Y-C, Shaw PD, Farrand SK (1998) Production of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by Gram-Negative Plant-Associated Bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11:1119–1129

Chamroux S (1966) [Ecologic distribution of ocean sediment bacteria as a function of their nutritional requirements]. *Ann Inst Pasteur* 110:923–928

Chan YY, Bian HS, Tan TMC, Mattmann ME, Geske GD, Igarashi J, Hatano T, Suga H, Blackwell HE, Chua KL (2007) Control of Quorum Sensing by a *Burkholderia pseudomallei* Multidrug Efflux Pump. *J Bacteriol* 189:4320–4324

Chen R, Barphagha IK, Karki HS, Ham JH (2012) Dissection of Quorum-Sensing Genes in *Burkholderia glumae* Reveals Non-Canonical Regulation and the New Regulatory Gene *tofM* for Toxoflavin Production. *PLoS ONE* 7

Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415:545–549

Chiarello M, Villéger S, Bouvier C, Bettarel Y, Bouvier T (2015) High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiol Ecol* 91:fiv061

Choi DH, Cho J-C, Lanoil BD, Giovannoni SJ, Cho BC (2007) *Maribius salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a solar saltern and *Maribius pelagius* sp. nov., cultured from the Sargasso Sea, belonging to the Roseobacter clade. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:270–275

Chowdhary PK, Keshavan N, Nguyen HQ, Peterson JA, González JE, Haines DC (2007) *Bacillus megaterium* CYP102A1 Oxidation of Acyl Homoserine Lactones and Acyl Homoserines†. *Biochemistry (Mosc)* 46:14429–14437

Christensen AB (2003) Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiology* 149:471–483

Chung J, Goo E, Yu S, Choi O, Lee J, Kim J, Kim H, Igarashi J, Suga H, Moon JS, Hwang I, Rhee S (2011) Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase. *Proc Natl Acad Sci* 108:12089–12094

Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP (2004) Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3587–3590

Churchill MEA, Chen L (2011) Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling. *Chem Rev* 111:68–85

Clarke MB, Sperandio V (2005) Transcriptional autoregulation by quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC) in enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). *Mol Microbiol* 58:441–455

Clough SJ, Lee KE, Schell MA, Denny TP (1997) A two-component system in *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* 179:3639–3648

Cooper J e. (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol* 103:1355–1365

Cope CL (1964) Animal and Plant Hormones. *Br Med J* 2:432–433

Coulthurst SJ, Clare S, Evans TJ, Foulds IJ, Roberts KJ, Welch M, Dougan G, Salmond GPC (2007) Quorum sensing has an unexpected role in virulence in the model pathogen *Citrobacter rodentium*. *EMBO Rep* 8:698–703

Courties A, Riedel T, Jarek M, Intertaglia L, Lebaron P, Suzuki MT (2013) Genome Sequence of Strain MOLA814, a Proteorhodopsin-Containing Representative of the Betaproteobacteria Common in the Ocean. *Genome Announc* 1

Courties A, Riedel T, Jarek M, Papadatou M, Intertaglia L, Lebaron P, Suzuki MT (2014) Draft Genome Sequence of the Gammaproteobacterial Strain MOLA455, a Representative of a Ubiquitous Proteorhodopsin-Producing Group in the Ocean. *Genome Announc* 2

Crépin A, Barbey C, Cirou A, Tannières M, Orange N, Feuilloley M, Dessaux Y, Burini J-F, Faure D, Latour X (2011) Biological control of pathogen communication in the rhizosphere:

A novel approach applied to potato soft rot due to *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Soil* 358:27–37

Crespi BJ (2001) The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends Ecol Evol* 16:178–183

Crespo BG, Pommier T, Fernández-Gómez B, Pedrós-Alió C (2013) Taxonomic composition of the particle-attached and free-living bacterial assemblages in the Northwest Mediterranean Sea analyzed by pyrosequencing of the 16S rRNA. *MicrobiologyOpen* 2:541–552

Cuadrado-Silva CT, Castellanos L, Arévalo-Ferro C, Osorno OE (2013) Detection of quorum sensing systems of bacteria isolated from fouled marine organisms. *Biochem Syst Ecol* 46:101–107

Cude WN, Buchan A (2013) Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing in the *Roseobacter* clade: complex cell-to-cell communication controls multiple physiologies. *Front Microbiol* 4

Cullinane M, Baysse C, Morrissey JP, O’Gara F (2005) Identification of two lysophosphatidic acid acyltransferase genes with overlapping function in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151:3071–3080

Cunliffe M, Murrell JC (2009) The sea-surface microlayer is a gelatinous biofilm. *ISME J* 3:1001–1003

Currs M, Magarios B, Toranzo AE, Romalde JL (2002) Dormancy as a survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment. *Dis Aquat Organ* 52:129–136

D

Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 28:261–289

Darch SE, West SA, Winzer K, Diggle SP (2012) Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci* 109:8259–8263

Davies PJ (2010) The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davies PJ (ed) *Plant Hormones*. Springer Netherlands, p 1–15

Decho AW, Norman RS, Visscher PT (2010) Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends Microbiol* 18:73–80

Defoirdt T, Boon N, Bossier P, Verstraete W (2004) Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240:69–88

De Maeyer K, D’aes J, Hua GKH, Perneel M, Vanhaecke L, Noppe H, Hofte M (2011) N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing *Pseudomonas* isolates from the red cocoyam rhizosphere. *Microbiology* 157:459–472

- Deng Y, Lim A, Lee J, Chen S, An S, Dong Y-H, Zhang L-H (2014) Diffusible signal factor (DSF) quorum sensing signal and structurally related molecules enhance the antimicrobial efficacy of antibiotics against some bacterial pathogens. *BMC Microbiol* 14:51
- Dickschat JS (2010) Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* 27:343–369
- Diggie SP, Crusz SA, Cámara M (2007) Quorum sensing. *Curr Biol CB* 17:R907–910
- Diggie SP, Gardner A, West SA, Griffin AS (2007) Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 362:1241–1249
- Diggie SP, Matthijs S, Wright VJ, Fletcher MP, Chhabra SR, Lamont IL, Kong X, Hider RC, Cornelis P, Cámara M, Williams P (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. *Chem Biol* 14:87–96
- Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Croue J, Suzuki M, Lebaron P, Lami R (2014) Genome Sequence of the Sponge-Associated *Ruegeria halocynthiae* Strain MOLA R1/13b, a Marine Roseobacter with Two Quorum-Sensing-Based Communication Systems. *Genome Announc* 2
- Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Joux F, Lebaron P, Lami R (2014) Genome Sequence of *Maribius* sp. Strain MOLA 401, a Marine Roseobacter with a Quorum-Sensing Cell-Dependent Physiology. *Genome Announc* 2:e00997–14
- Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Toulza E, Lebaron P, Lami R (2015) Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling metagenomic database. *Aquat Microb Ecol* 74:107–119
- Dobretsov S, Teplitski M, Bayer M, Gunasekera S, Proksch P, Paul VJ (2011) Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* 27:893–905
- Dobretsov S, Teplitski M, Paul V (2009) Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* 25:413–427
- Dong Y-H, Wang L-H, Xu J-L, Zhang H-B, Zhang X-F, Zhang L-H (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813–817
- Dong Y-H, Zhang L-H (2005) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* 43:101–109
- Duerkop BA, Varga J, Chandler JR, Peterson SB, Herman JP, Churchill MEA, Parsek MR, Nierman WC, Greenberg EP (2009) Quorum-Sensing Control of Antibiotic Synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *J Bacteriol* 191:3909–3918
- Dupont CL, Rusch DB, Yooseph S, Lombardo M-J, Alexander Richter R, Valas R, Novotny M, Yee-Greenbaum J, Selengut JD, Haft DH, Halpern AL, Lasken RS, Neilson K, Friedman R, Craig Venter J (2012) Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. *ISME J* 6:1186–1199

Du Y-L, Shen X-L, Yu P, Bai L-Q, Li Y-Q (2011) Gamma-butyrolactone regulatory system of *Streptomyces chattanoogensis* links nutrient utilization, metabolism, and development. *Appl Environ Microbiol* 77:8415–8426

Dworkin M, Falkow S (2006) *The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer Science & Business Media

Dworkin M, Gutnick D (2012) Sergei Winogradsky: a founder of modern microbiology and the first microbial ecologist. *FEMS Microbiol Rev* 36:364–379

E

Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry (Mosc)* 20:2444–2449

Eberl L (1999) N-Acyl Homoserinelactone-mediated Gene Regulation in Gram-negative Bacteria. *Syst Appl Microbiol* 22:493–506

Edwards A, Frederix M, Wisniewski-Dyé F, Jones J, Zorreguieta A, Downie JA (2009) The *cin* and *rai* Quorum-Sensing Regulatory Systems in *Rhizobium leguminosarum* Are Coordinated by ExpR and CinS, a Small Regulatory Protein Coexpressed with CinI. *J Bacteriol* 191:3059–3067

Egan S, Harder T, Burke C, Steinberg P, Kjelleberg S, Thomas T (2013) The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. *FEMS Microbiol Rev* 37:462–476

Eisner T, Meinwald J (1995) Chemical ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1

ElAhwany AMD, Ghozlan HA, ElSharif HA, Sabry SA (2015) Phylogenetic diversity and antimicrobial activity of marine bacteria associated with the soft coral *Sarcophyton glaucum*. *J Basic Microbiol* 55:2–10

Elifantz H, Horn G, Ayon M, Cohen Y, Minz D (2013) Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol Ecol* 85:348–357

Engebrecht J, Nealson K, Silverman M (1983) Bacterial bioluminescence: Isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32:773–781

Engebrecht J, Silverman M (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci* 81:4154–4158

F

Farah C, Vera M, Morin D, Haras D, Jerez CA, Guilian N (2005) Evidence for a Functional Quorum-Sensing Type AI-1 System in the Extremophilic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 71:7033–7040

Fekete A, Frommberger M, Rothballer M, Li X, Englmann M, Fekete J, Hartmann A, Eberl L, Schmitt-Kopplin P (2007) Identification of bacterial N-acylhomoserine lactones (AHLs)

with a combination of ultra-performance liquid chromatography (UPLC), ultra-high-resolution mass spectrometry, and in-situ biosensors. *Anal Bioanal Chem* 387:455–467

Flavier AB, Ganova-Raeva LM, Schell MA, Denny TP (1997) Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J Bacteriol* 179:7089–7097

Fontanez KM, Eppley JM, Samo TJ, Karl DM, DeLong EF (2015) Microbial community structure and function on sinking particles in the North Pacific Subtropical Gyre. *Front Microbiol* 6

Forêt R (2004) Dico de bio: 7304 définitions pour un panorama complet des sciences de la vie : tableaux synthétiques, traduction anglaise de chaque mot, index anglais/français. De Boeck

Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl* 28:3150–3152

Fuqua C, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:685–695

Fuqua C, Winans SC (1996) Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol* 178:435–440

Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176:269–275

G

Galloway WRJD, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR (2011) Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways. *Chem Rev* 111:28–67

Gao M, Chen H, Eberhard A, Gronquist MR, Robinson JB, Rolfe BG, Bauer WD (2005) *sinI*- and *expR*-Dependent Quorum Sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 187:7931–7944
Garcias-Bonet N, Arrieta JM, Santana CN de, Duarte CM, Marbà N (2012) Endophytic bacterial community of a Mediterranean marine angiosperm (*Posidonia oceanica*). *Aquat Microbiol* 3:342

Gelencsér Z, Choudhary KS, Coutinho BG, Hudaiberdiev S, Galbáts B, Venturi V, Pongor S (2012) Classifying the Topology of AHL-Driven Quorum Sensing Circuits in Proteobacterial Genomes. *Sensors* 12:5432–5444

Geng H, Belas R (2010a) Molecular mechanisms underlying roseobacter–phytoplankton symbioses. *Curr Opin Biotechnol* 21:332–338

Geng H, Belas R (2010b) Expression of Tropodithietic Acid Biosynthesis Is Controlled by a

Novel Autoinducer. *J Bacteriol* 192:4377–4387

Geng H, Bruhn JB, Nielsen KF, Gram L, Belas R (2008) Genetic Dissection of Tropodithietic Acid Biosynthesis by Marine Roseobacters. *Appl Environ Microbiol* 74:1535–1545

Geske GD, O'Neill JC, Blackwell HE (2007) N-Phenylacetanoyl-L-Homoserine Lactones Can Strongly Antagonize or Superagonize Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*. *ACS Chem Biol* 2:315–319

Geske GD, O'Neill JC, Miller DM, Mattmann ME, Blackwell HE (2007) Modulation of Bacterial Quorum Sensing with Synthetic Ligands: Systematic Evaluation of N-Acylated Homoserine Lactones in Multiple Species and New Insights into Their Mechanisms of Action. *J Am Chem Soc* 129:13613–13625

Ghiglione JF, Mevel G, Pujo-Pay M, Mousseau L, Lebaron P, Goutx M (2007) Diel and Seasonal Variations in Abundance, Activity, and Community Structure of Particle-Attached and Free-Living Bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 54:217–231

Gilson L, Kuo A, Dunlap PV (1995) AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* 177:6946–6951

Giovannoni S, Rappé M (2000) Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Kirchman D (ed) Wiley-Liss Inc, New York, p 47–84

Giovannoni SJ, Stingl U (2005) Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437:343–348

Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R (1999) Bacterioplankton Compositions of Lakes and Oceans: a First Comparison Based on Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65:3721–3726

Golberg K, Eltzov E, Shnit-Orland M, Marks RS, Kushmaro A (2011) Characterization of Quorum Sensing Signals in Coral-Associated Bacteria. *Microb Ecol* 61:783–792

Gontang EA, Fenical W, Jensen PR (2007) Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* 73:3272–3282

González JE, Keshavan ND (2006) Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:859–875

Gonzalez JE, Marketon MM (2003) Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:574–592

Gould TA, Schweizer HP, Churchill MEA (2004) Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserine lactone synthase LasI. *Mol Microbiol* 53:1135–1146

Goulitquer S, Potin P, Tonon T (2012) Mass Spectrometry-Based Metabolomics to Elucidate Functions in Marine Organisms and Ecosystems. *Mar Drugs* 10:849–880

Gram L, Grossart H-P, Schlingloff A, Kjørboe T (2002) Possible Quorum Sensing in Marine Snow Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by Roseobacter Strains Isolated

from Marine Snow. *Appl Environ Microbiol* 68:4111–4116

Gray KM, Garey JR (2001) The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* 147:2379–2387

Gray JP, Herwig RP (1996) Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 62:4049–4059

Grossart H-P, Kjørboe T, Tang K, Ploug H (2003) Bacterial Colonization of Particles: Growth and Interactions. *Appl Environ Microbiol* 69:3500–3509

Gu Q, Fu L, Wang Y, Lin J (2013) Identification and Characterization of Extracellular Cyclic Dipeptides As Quorum-Sensing Signal Molecules from *Shewanella baltica*, the Specific Spoilage Organism of *Pseudosciaena crocea* during 4 °C Storage. *J Agric Food Chem* 61:11645–11652

Guibert LM, Loviso CL, Marcos MS, Commendatore MG, Dionisi HM, Lozada M (2012) Alkane Biodegradation Genes from Chronically Polluted Subantarctic Coastal Sediments and Their Shifts in Response to Oil Exposure. *Microb Ecol* 64:605–616

Gunn BA, Colwell RR (1983) Numerical Taxonomy of Staphylococci Isolated from the Marine Environment. *Int J Syst Bacteriol* 33:751–759

H

Habeck M (2003) Stop talking at the back. *Drug Discov Today* 7:279–280

Hao G, Burr TJ (2006) Regulation of Long-Chain N-Acyl-Homoserine Lactones in *Agrobacterium vitis*. *J Bacteriol* 188:2173–2183

Hardoim CCP, Costa R, Araújo FV, Hajdu E, Peixoto R, Lins U, Rosado AS, Elsas JD van (2009) Diversity of Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian Coastal Waters. *Appl Environ Microbiol* 75:3331–3343

Harrington C, Reen FJ, Mooij MJ, Stewart FA, Chabot J-B, Guerra AF, Glöckner FO, Nielsen KF, Gram L, Dobson ADW, Adams C, O’Gara F (2014) Characterisation of Non-Autoinducing Tropodithietic Acid (TDA) Production from Marine Sponge *Pseudovibrio* Species. *Mar Drugs* 12:5960–5978

Hastings JW, Greenberg EP (1999) Quorum Sensing: the Explanation of a Curious Phenomenon Reveals a Common Characteristic of Bacteria. *J Bacteriol* 181:2667–2668

Håvarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA (1995) An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11140–11144

Haygood MG, Distel DL, Herring PJ (1992) Polymerase chain reaction and 16S rRNA gene sequences from the luminous bacterial symbionts of two deep-sea anglerfishes. *J Mar Biol Assoc U K*

Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR (2002) Bacteria of the γ -Subclass Proteobacteria

Associated with Zooplankton in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 68:5498–5507

Henke JM, Bassler BL (2004) Three Parallel Quorum-Sensing Systems Regulate Gene Expression in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 186:6902–6914

Hense BA, Kuttler C, Müller J, Rothballer M, Hartmann A, Kreft J-U (2007) Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol* 5:230–239

Hmelo LR, Mincer TJ, Van Mooy BAS (2011) Possible influence of bacterial quorum sensing on the hydrolysis of sinking particulate organic carbon in marine environments. *Environ Microbiol Rep* 3:682–688

Hmelo L, Mooy BASV (2009) Kinetic constraints on acylated homoserine lactone-based quorum sensing in marine environments. *Aquat Microb Ecol* 54:127–133

Hogan DA (2006) Quorum Sensing: Alcohols in a Social Situation. *Curr Biol* 16:R457–R458

Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 5:1663–1674

Holden MTG, Ram Chhabra S, De Nys R, Stead P, Bainton NJ, Hill PJ, Manefield M, Kumar N, Labatte M, England D, Rice S, Givskov M, Salmond GPC, Stewart GSAB, Bycroft BW,

Hollants J, Leliaert F, Clerck OD, Willems A (2013) What we can learn from sushi: a review on seaweed–bacterial associations. *FEMS Microbiol Ecol* 83:1–16

Holm A, Vikström E (2014) Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets, and functions. *Front Plant Sci* 5

Hoopen P ten, Pesant S, Kottmann R, Kopf A, Bicak M, Claus S, Deneudt K, Borremans C, Thijsse P, Dekeyser S, Schaap DM, Bowler C, Glöckner FO, Cochrane G (2015) Marine microbial biodiversity, bioinformatics and biotechnology (M2B3) data reporting and service standards. *Stand Genomic Sci* 10

Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW (2001) Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Appl Environ Microbiol* 67:2982–2992

Horng Y-T, Deng S-C, Daykin M, Soo P-C, Wei J-R, Luh K-T, Ho S-W, Swift S, Lai H-C, Williams P (2002) The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* 45:1655–1671

Horswill AR, Stoodley P, Stewart PS, Parsek MR (2006) The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Anal Bioanal Chem* 387:371–380

Hothersall J, Murphy AC, Iqbal Z, Campbell G, Stephens ER, Wu J, Cooper H, Atkinson S, Williams P, Crosby J, Willis CL, Cox RJ, Simpson TJ, Thomas CM (2011) Manipulation of quorum sensing regulation in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 to increase mupirocin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1017–1026

Houdt RV, Moons P, Buij MH, Michiels CW (2006) N-Acyl-L-Homoserine Lactone Quorum Sensing Controls Butanediol Fermentation in *Serratia plymuthica* RVH1 and *Serratia marcescens* MG1. *J Bacteriol* 188:4570–4572

Hudaiberdiev S, Choudhary KS, Vera Alvarez R, Gelencsér Z, Ligeti B, Lamba D, Pongor S (2015) Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. *Front Cell Infect Microbiol* 5

Hughes DT, Sperandio V (2008) Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* 6:111–120

I

Ivanova EP, Vysotskii MV, Svetashev VI, Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Mikhailov VV, Yumoto N, Shigeri Y, Taguchi T, Yoshikawa S (2010) Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int Microbiol* 2:267–271

J

Jatt AN, Tang K, Liu J, Zhang Z, Zhang X-H (2015) Quorum sensing in marine snow and its possible influence on production of extracellular hydrolytic enzymes in marine snow bacterium *Pantoea ananatis* B9. *FEMS Microbiol Ecol* 91:1–13

Ji G, Beavis RC, Novick RP (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12055–12059

Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ (2012) The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:46–65

Jitackorn S, Sadowsky MJ (2008) Nodulation Gene Regulation and Quorum Sensing Control Density-Dependent Suppression and Restriction of Nodulation in the *Bradyrhizobium japonicum*-Soybean Symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 74:3749–3756

Jones BW, Nishiguchi MK (2004) Counterillumination in the Hawaiian bobtail squid, *Euprymna scolopes* Berry (Mollusca: Cephalopoda). *Mar Biol* 144:1151–1155

K

Kaiser D (2004) Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* 58:75–98

Kalia VC (2013) Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol Adv* 31:224–245

Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, Smith DC, D'Hondt S (2012) Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc Natl Acad Sci* 109:16213–16216

Kanagasabhapathy M, Yamazaki G, Ishida A, Sasaki H, Nagata S (2009) Presence of quorum-sensing inhibitor-like compounds from bacteria isolated from the brown alga *Colpomenia sinuosa*. *Lett Appl Microbiol* 49:573–579

- Kanamaru K, Kanamaru K, Tatsuno I, Tobe T, Sasakawa C (2000) SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 38:805–816
- Kaplan HB, Greenberg EP (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 163:1210–1214
- Karl DM (2002) Microbiological oceanography: Hidden in a sea of microbes. *Nature* 415:590–591
- Kastbjerg VG, Nielsen KF, Dalsgaard I, Rasch M, Bruhn J b., Givskov M, Gram L (2007) Profiling acylated homoserine lactones in *Yersinia ruckeri* and influence of exogenous acyl homoserine lactones and known quorum-sensing inhibitors on protease production. *J Appl Microbiol* 102:363–374
- Kaufmann GF, Sartorio R, Lee S-H, Rogers CJ, Meijler MM, Moss JA, Clapham B, Brogan AP, Dickerson TJ, Janda KD (2005) Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:309–314
- Keller L, Surette MG (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 4:249–258
- Kelly RC, Bolitho ME, Higgins DA, Lu W, Ng W-L, Jeffrey PD, Rabinowitz JD, Semmelhack MF, Hughson FM, Bassler BL (2009) The *Vibrio cholerae* quorum-sensing autoinducer CAI-1: analysis of the biosynthetic enzyme CqsA. *Nat Chem Biol* 5:891–895
- Khadar SM, Shunmugiah KP, Arumugam VR (2011) Inhibition of quorum-sensing-dependent phenotypic expression in *Serratia marcescens* by marine sediment *Bacillus* spp. SS4. *Ann Microbiol* 62:443–447
- Kievit TR de, Iglewski BH (2000) Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infect Immun* 68:4839–4849
- Kim SK, Kaiser D (1990) Purification and properties of *Myxococcus xanthus* C-factor, an intercellular signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3635–3639
- Kim J, Park W (2013) Identification and characterization of genes regulated by AqsR, a LuxR-type regulator in *Acinetobacter oleivorans* DR1. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:6967–6978
- Kimura N (2014) Metagenomic approaches to understanding phylogenetic diversity in quorum sensing. *Virulence* 5:433–442
- Kjørboe T, Tang K, Grossart H-P, Ploug H (2003) Dynamics of Microbial Communities on Marine Snow Aggregates: Colonization, Growth, Detachment, and Grazing Mortality of Attached Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69:3036–3047
- Kirwan JP, Gould TA, Schweizer HP, Bearden SW, Murphy RC, Churchill MEA (2006) Quorum-Sensing Signal Synthesis by the *Yersinia pestis* Acyl-Homoserine Lactone Synthase

Kjelleberg S, Williams P (1999) Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 33:1254–1266
YspI. *J Bacteriol* 188:784–788

Kleerebezem M (2004) Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* 25:1405–1414

Kleerebezem M, Quadri LEN, Kuipers OP, De Vos WM (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24:895–904

Konovalova A, Wegener-Feldbrügge S, Søgaard-Andersen L (2012) Two intercellular signals required for fruiting body formation in *Myxococcus xanthus* act sequentially but non-hierarchically. *Mol Microbiol* 86:65–81

Kovacikova G, Skorupski K (2002) Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the *aphA* promoter. *Mol Microbiol* 46:1135–1147

Krick A, Kehraus S, Eberl L, Riedel K, Anke H, Kaesler I, Graeber I, Szewzyk U, König GM (2007) A Marine Mesorhizobium sp. Produces Structurally Novel Long-Chain N-Acyl-l-Homoserine Lactones. *Appl Environ Microbiol* 73:3587–3594

Krumphanzl V (1982) Overproduction of microbial products. Academic Press

L

Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S (2004) Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 186:692–698

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948

Laue BE, Jiang Y, Chhabra SR, Jacob S, Stewart GSAB, Hardman A, Downie JA, O’Gara F, Williams P (2000) The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146:2469–2480

Lee J-H, Lee J (2010) Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 34:426–444

Lee MS, Morrison DA (1999) Identification of a New Regulator in *Streptococcus pneumoniae* Linking Quorum Sensing to Competence for Genetic Transformation. *J Bacteriol* 181:5004–5016

Lerat E, Moran NA (2004) The Evolutionary History of Quorum-Sensing Systems in

Bacteria. *Mol Biol Evol* 21:903–913

Letunic I, Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23:127–128

Letunic I, Bork P (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* 39:W475–W478

Lewenza S, Conway B, Greenberg EP, Sokol PA (1999) Quorum Sensing in *Burkholderia cepacia*: Identification of the LuxRI Homologs CepRI. *J Bacteriol* 181:748–756

Li X, Dobretsov S, Xu Y, Xiao X, Hung OS, Qian P-Y (2006) Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*. *Biofouling* 22:201–208

Li X, Fekete A, Englmann M, Götz C, Rothballer M, Frommberger M, Buddrus K, Fekete J, Cai C, Schröder P, Hartmann A, Chen G, Schmitt-Kopplin P (2006) Development and application of a method for the analysis of N-acylhomoserine lactones by solid-phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1134:186–193

Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659

Limardo AJ, Worden AZ (2015) Microbiology: Exclusive networks in the sea. *Nature* 522:36–37

Lindemann A, Pessi G, Schaefer AL, Mattmann ME, Christensen QH, Kessler A, Hennecke H, Blackwell HE, Greenberg EP, Harwood CS (2011) Isovaleryl-homoserine lactone, an unusual branched-chain quorum-sensing signal from the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci* 108:16765–16770

Liu X, Bimerew M, Ma Y, Müller H, Ovadis M, Eberl L, Berg G, Chernin L (2007) Quorum-sensing signaling is required for production of the antibiotic pyrrolnitrin in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymuthica*. *FEMS Microbiol Lett* 270:299–305

Liu X, Jia J, Popat R, Ortori CA, Li J, Diggle SP, Gao K, Cámara M (2011) Characterisation of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. *BMC Microbiol* 11:26

Li J, Wei B, Wang J, Liu Y, Dasgupta S, Zhang L, Fang J Variation in abundance and community structure of particle-attached and free-living bacteria in the South China Sea. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr*

Llamas I, Quesada E, Martínez-Cánovas MJ, Gronquist M, Eberhard A, González JE (2005) Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. *Extrem Life Extreme Cond* 9:333–341

Loh J, Carlson RW, York WS, Stacey G (2002) Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14446–14451

Loh J, Pierson EA, Pierson III LS, Stacey G, Chatterjee A (2002) Quorum sensing in plant-

associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 5:285–290

M

Maayer PD, Chan W-Y, Blom J, Venter SN, Duffy B, Smits THM, Coutinho TA (2012) The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. *BMC Genomics* 13:625

Majerczyk C, Brittnacher M, Jacobs M, Armour CD, Radey M, Schneider E, Phattarasokul S, Bunt R, Greenberg EP (2014) Global Analysis of the *Burkholderia thailandensis* Quorum Sensing-Controlled Regulon. *J Bacteriol* 196:1412–1424

Majerczyk C, Kinman L, Han T, Bunt R, Greenberg EP (2013) Virulence of *Burkholderia mallei* Quorum-Sensing Mutants. *Infect Immun* 81:1471–1478

Malone CL, Boles BR, Horswill AR (2007) Biosynthesis of *Staphylococcus aureus* Autoinducing Peptides by Using the *Synechocystis* DnaB Mini-Intein. *Appl Environ Microbiol* 73:6036–6044

Malott RJ, Baldwin A, Mahenthiralingam E, Sokol PA (2005) Characterization of the *cciIR* Quorum-Sensing System in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* 73:4982–4992

Malott RJ, Sokol PA (2007) Expression of the *bviIR* and *cepIR* Quorum-Sensing Systems of *Burkholderia vietnamiensis*. *J Bacteriol* 189:3006–3016

Manefield M, Rasmussen TB, Henzter M, Andersen JB, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M (2002) Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiol Read Engl* 148:1119–1127

March JC, Bentley WE (2004) Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 15:495–502

Marketon MM, Glenn SA, Eberhard A, González JE (2003) Quorum Sensing Controls Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 185:325–331

Martin M, Portetelle D, Michel G, Vandenbol M (2014) Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2917–2935

Martins MB, Carvalho I (2007) Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron* 63:9923–9932

Mashburn-Warren L, Howe J, Garidel P, Richter W, Steiniger F, Roessle M, Brandenburg K, Whiteley M (2008) Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol Microbiol* 69:491–502

McClean AE, Duerkop BA, Greenberg EP, Kluepfel DA (2012) AHL Signals Induce Rubrifacine Production in a *bruI* Mutant of *Brenneria rubrifaciens*. *Phytopathology* 102:195–

McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol Read Engl* 143 (Pt 12):3703–3711

McDougald D, Rice SA, Kjelleberg S (2007) Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Anal Bioanal Chem* 387:445–453

McKenney D, Brown KE, Allison DG (1995) Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. *J Bacteriol* 177:6989–6992

McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC (2000) The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates *rhl* Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182:2702–2708

Meighen EA (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev* 55:123–142

Meighen EA (1993) Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. *FASEB J* 7:1016–1022

Meighen EA, Dunlap PV (1993) Physiological, biochemical and genetic control of bacterial bioluminescence. *Adv Microb Physiol* 34:1–67

Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165–199
Miller SD, Haddock SHD, Elvidge CD, Lee TF (2005) Detection of a bioluminescent milky sea from space. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14181–14184

Miller SD, Haddock SHD, Elvidge CD, Lee TF (2006) Twenty thousand leagues over the seas: the first satellite perspective on bioluminescent “milky seas.” *Int J Remote Sens* 27:5131–5143

Miller ST, Xavier KB, Campagna SR, Taga ME, Semmelhack MF, Bassler BL, Hughson FM (2004) *Salmonella typhimurium* Recognizes a Chemically Distinct Form of the Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2. *Mol Cell* 15:677–687

Milton DL (2006) Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *Int J Med Microbiol* 296:61–71

Milton DL, Chalker VJ, Kirke D, Hardman A, Cámara M, Williams P (2001) The LuxM Homologue VanM from *Vibrio anguillarum* Directs the Synthesis of N-(3-Hydroxyhexanoyl)homoserine Lactone and N-Hexanoylhomoserine Lactone. *J Bacteriol* 183:3537–3547

Milton DL, Hardman A, Camara M, Chhabra SR, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P (1997) Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the *vanI/vanR* locus and identification of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J Bacteriol* 179:3004–3012

Mohamed NM, Cicirelli EM, Kan J, Chen F, Fuqua C, Hill RT (2008) Diversity and quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. *Environ Microbiol* 10:75–86

Mok KC, Wingreen NS, Bassler BL (2003) *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *EMBO J* 22:870–881

Mooy BAS Van, Hmelo LR, Sofen LE, Campagna SR, May AL, Dyhrman ST, Heithoff A, Webb EA, Momper L, Mincer TJ (2012a) Quorum sensing control of phosphorus acquisition in *Trichodesmium* consortia. *ISME J* 6:422–429

Moran MA, Buchan A, González JM, Heidelberg JF, Whitman WB, Kiene RP, Henriksen JR, King GM, Belas R, Fuqua C, Brinkac L, Lewis M, Johri S, Weaver B, Pai G, Eisen JA, Rahe E, Sheldon WM, Ye W, Miller TR, Carlton J, Rasko DA, Paulsen IT, Ren Q, Daugherty SC, Deboy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Nelson WC, Sullivan SA, Rosovitz MJ, Haft DH, Selengut J, Ward N (2004) Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature* 432:910–913

Moreno-Hagelsieb G, Latimer K (2008) Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. *Bioinformatics* 24:319–324

Mori K (2013) Chemical Ecology. In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier

Morohoshi T, Inaba T, Kato N, Kanai K, Ikeda T (2004) Identification of quorum-sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. *J Biosci Bioeng* 98:274–281

Morohoshi T, Kato M, Fukamachi K, Kato N, Ikeda T (2008) N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett* 279:124–130

Morohoshi T, Nakamura Y, Yamazaki G, Ishida A, Kato N, Ikeda T (2007) The Plant Pathogen *Pantoea ananatis* Produces N-Acylhomoserine Lactone and Causes Center Rot Disease of Onion by Quorum Sensing. *J Bacteriol* 189:8333–8338

Moroshi T, Nakazawa S, Ebata A, Kato N, Ikeda T (2008) Identification and Characterization of N-Acylhomoserine Lactone-Acylase from the Fish Intestinal *Shewanella* sp. Strain MIB015. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:1887–1893

Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, Giovannoni SJ (2002) SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420:806–810

N

Nealson KH (1977) Autoinduction of bacterial luciferase. *Arch Microbiol* 112:73–79

Nealson KH (1979) Bioluminescence. *Science* 205:893

Nealson KH, Hastings JW (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 43:496–518

Nealson KH, Hastings JW (2006) Quorum Sensing on a Global Scale: Massive Numbers of Bioluminescent Bacteria Make Milky Seas. *Appl Environ Microbiol* 72:2295–2297

Nealson KH, Platt T, Hastings JW (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System1. *J Bacteriol* 104:313–322

Nguyen YN, Sheng H, Dakarapu R, Falck JR, Hovde CJ, Sperandio V (2013) The Acyl-Homoserine Lactone Synthase YenI from *Yersinia enterocolitica* Modulates Virulence Gene Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 81:4192–4199

Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM (2006) Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. *Appl Environ Microbiol* 72:3805–3813

Nickzad A, Lépine F, Déziel E (2015) Quorum Sensing Controls Swarming Motility of *Burkholderia glumae* through Regulation of Rhamnolipids. *PLoS ONE* 10

Nieto Penalver CG, Morin D, Cantet F, Saurel O, Milon A, Vorholt JA (2006) *Methylobacterium extorquens* AM1 produces a novel type of acyl-homoserine lactone with a double unsaturated side chain under methylotrophic growth conditions. *FEBS Lett* 580:561–567

Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN (2008) Isolation and Characterization of an Autoinducer Synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 190:3386–3392

O

Oleskin AV, Botvinko IV, Tsavkelova EA (2000) [Colonial organization and intercellular communication of microorganisms]. *Mikrobiologiya* 69:309–327

Owings DH, Morton ES (1998) *Animal Vocal Communication: A New Approach*. Cambridge University Press

P

Paggi RA, Martone CB, Fuqua C, Castro RED (2003) Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiol Lett* 221:49–52

Pande GSJ, Natrah FMI, Sorgeloos P, Bossier P, Defoirdt T (2013) The *Vibrio campbellii* quorum sensing signals have a different impact on virulence of the bacterium towards different crustacean hosts. *Vet Microbiol* 167:540–545

Parsek MR, Greenberg EP (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 13:27–33

Parthasarathy H, Hill E, MacCallum C (2007) Global Ocean Sampling Collection. *PLoS Biol* 5:e83

Pasmore M, Costerton JW (2003) Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:407–413

Patzelt D, Wang H, Buchholz I, Rohde M, Gröbe L, Pradella S, Neumann A, Schulz S, Heyber S, Münch K, Münch R, Jahn D, Wagner-Döbler I, Tomasch J (2013) You are what you talk: quorum sensing induces individual morphologies and cell division modes in *Dinoroseobacter shibae*. *ISME J* 7:2274–2286

Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH (1999) Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *J Bacteriol* 181:1203–1210

Pestova EV, Håvarstein LS, Morrison DA (1996) Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* 21:853–862

Pierson EA, Wood DW, Cannon JA, Blachere FM, Pierson LS (1998) Interpopulation Signaling via *N*-Acyl-Homoserine Lactones among Bacteria in the Wheat Rhizosphere. *Mol Plant Microbe Interact* 11:1078–1084

Plamann L, Li Y, Cantwell B, Mayor J (1995) The *Myxococcus xanthus* *asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J Bacteriol* 177:2014–2020

Pomeroy LR (1974) The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *BioScience* 24:499–504
Pomeroy L, Williams P leB., Azam F, Hobbie J (2007) The Microbial Loop. *Oceanography* 20:28–33

Poonguzhali S, Madhaiyan M, Sa T (2007) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals is widespread in gram-negative *Methylobacterium*. *J Microbiol Biotechnol* 17:226–233

Popat R, Cornforth DM, McNally L, Brown SP (2015) Collective sensing and collective responses in quorum-sensing bacteria. *J R Soc Interface* 12:20140882

Porsby CH, Webber MA, Nielsen KF, Piddock LJV, Gram L (2011) Resistance and Tolerance to Tropodithietic Acid, an Antimicrobial in Aquaculture, Is Hard To Select. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1332–1337

Prakash T, Taylor TD (2012) Functional assignment of metagenomic data: challenges and applications. *Brief Bioinform* 13:711–727

Prol Garcia MJ, D'Alvise PW, Gram L (2013) Disruption of Cell-to-Cell Signaling Does Not Abolish the Antagonism of *Phaeobacter gallaeciensis* toward the Fish Pathogen *Vibrio anguillarum* in Algal Systems. *Appl Environ Microbiol* 79:5414–5417

Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, Schaefer AL (1997) A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 179:7530–7537

R

- Rajamani S, Teplitski M, Kumar A, Krediet CJ, Sayre RT, Bauer WD (2011) N-acylhomoserine lactone lactonase, AiiA, inactivation of quorum sensing agonist produced by *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) and characterization of aiiA transgenic algae1. *J Phycol* 47:1219–1227
- Ramsey MM, Korgaonkar AK, Whiteley M (2009) Quorum-Sensing in Bacteria. In: Moselio Schaechter (ed) *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Academic Press, Oxford, p 357–374
- Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418:630–633
- Rasmussen TB (2006) Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* 152:895–904
- Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB, Eberl L, Anthoni U, Christophersen C, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M (2000) How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiol Read Engl* 146 Pt 12:3237–3244
- Redfield RJ (2002) Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* 10:365–370
- Reen, Mooij MJ, Holcombe LJ, McSweeney CM, McGlacken GP, Morrissey JP, O’Gara F (2011) The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), and its precursor HHQ, modulate interspecies and interkingdom behaviour. *FEMS Microbiol Ecol* 77:413–428
- Rivas M, Seeger M, Jedlicki E, Holmes DS (2007) Second Acyl Homoserine Lactone Production System in the Extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 73:3225–3231
- Roche DM (2004) Communications blackout? Do N-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology* 150:2023–2028
- Romero M, Martin-Cuadrado A-B, Otero A (2012) Determination of Whether Quorum Quenching Is a Common Activity in Marine Bacteria by Analysis of Cultivable Bacteria and Metagenomic Sequences. *Appl Environ Microbiol* 78:6345–6348
- Romero M, Martin-Cuadrado A-B, Roca-Rivada A, Cabello AM, Otero A (2011) Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 75:205–217
- Romesser JA, Wolfe RS, Mayer F, Spiess E, Walther-Mauruschat A (1979) *Methanogenium*, a new genus of marine methanogenic bacteria, and characterization of *Methanogenium cariaci* sp. nov. and *Methanogenium marisnigri* sp. nov. *Arch Microbiol* 121:147–153
- Ruby EG (1996) Lessons from a cooperative bacterial-animal association : The *Vibrio fischeri*–*Euprymna scolopes* Light Organ Symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 50:591–624
- Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, Wu D, Eisen JA, Hoffman JM, Remington K, Beeson K, Tran B, Smith H, Baden-Tillson H, Stewart C, Thorpe J, Freeman J, Andrews-Pfannkoch C, Venter JE, Li K, Kravitz S, Heidelberg JF,

Utterback T, Rogers Y-H, Falcón LI, Souza V, Bonilla-Rosso G, Eguiarte LE, Karl DM, Sathyendranath S, Platt T, Bermingham E, Gallardo V, Tamayo-Castillo G, Ferrari MR, Strausberg RL, Nealson K, Friedman R, Frazier M, Venter JC (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol* 5:e77

Rutherford ST, Bassler BL (2012) Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a012427

S

Sanchez-Contreras M, Bauer WD, Gao M, Robinson JB, Downie JA (2007) Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:1149–1163

Scavotto RE, Dziallas C, Bentzon-Tilia M, Riemann L, Moisander PH (2015) Nitrogen-fixing bacteria associated with copepods in coastal waters of the North Atlantic Ocean. *Environ Microbiol* 17:3754–3765

Schaefer AL, Greenberg EP, Oliver CM, Oda Y, Huang JJ, Bittan-Banin G, Peres CM, Schmidt S, Juhaszova K, Sufrin JR, Harwood CS (2008) A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* 454:595–599

Schaefer AL, Lappala CR, Morlen RP, Pelletier DA, Lu T-YS, Lankford PK, Harwood CS, Greenberg EP (2013) LuxR- and LuxI-Type Quorum-Sensing Circuits Are Prevalent in Members of the *Populus deltoides* Microbiome. *Appl Environ Microbiol* 79:5745–5752

Schaefer AL, Taylor TA, Beatty JT, Greenberg EP (2002) Long-Chain Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Regulation of *Rhodobacter capsulatus* Gene Transfer Agent Production. *J Bacteriol* 184:6515–6521

Schauder S, Bassler BL (2001) The languages of bacteria. *Genes Dev* 15:1468–1480

Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 41:463–476

Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M (2009) More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol* 17:189–195

Schmeisser C, Liesegang H, Krysciak D, Bakkou N, Le Quéré A, Wollherr A, Heinemeyer I, Morgenstern B, Pommerening-Röser A, Flores M, Palacios R, Brenner S, Gottschalk G, Schmitz RA, Broughton WJ, Perret X, Strittmatter AW, Streit WR (2009) *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Possesses a Remarkable Number of Secretion Systems. *Appl Environ Microbiol* 75:4035–4045

Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP (2003) Identification, Timing, and Signal Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Controlled Genes: a Transcriptome Analysis. *J Bacteriol* 185:2066–2079

Seshadri R, Kravitz SA, Smarr L, Gilna P, Frazier M (2007) CAMERA: A Community Resource for Metagenomics. *PLoS Biol* 5:e75

Seymour JR, Marcos and, Stocker R (2009) Resource Patch Formation and Exploitation throughout the Marine Microbial Food Web. *Am Nat* 173:E15–E29

Shapiro JA (1998) Thinking About Bacterial Populations as Multicellular Organisms. *Annu Rev Microbiol* 52:81–104

Sharif DI, Gallon J, Smith CJ, Dudley E (2008) Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909. *ISME J* 2:1171–1182

Simon (1990) Bacterial carbon dynamics on marine snow. *Mar Ecol-Prog Ser* 65:205–211
Singh RP, Baghel RS, Reddy CRK, Jha B (2015) Effect of quorum sensing signals produced by seaweed-associated bacteria on carpospore liberation from *Gracilaria dura*. *Front Plant Sci* 6

Singh RP, Reddy CRK (2014) Seaweed–microbial interactions: key functions of seaweed-associated bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 88:213–230

Skindersoe ME, Ettinger-Epstein P, Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Nys R de, Givskov M (2007) Quorum Sensing Antagonism from Marine Organisms. *Mar Biotechnol* 10:56–63

Slattery M, Rajbhandari I, Wesson K (2001) Competition-Mediated Antibiotic Induction in the Marine Bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. *Microb Ecol* 41:90–96

Smith RS, Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6:56–60

Song Y, Xie C, Ong Y-M, Gan Y-H, Chua K-L (2005) The BpsIR Quorum-Sensing System of *Burkholderia pseudomallei*. *J Bacteriol* 187:785–790

Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB (2003) Bacteria–host communication: The language of hormones. *Proc Natl Acad Sci* 100:8951–8956

Steidle A, Sigl K, Schuegger R, Ihring A, Schmid M, Gantner S, Stoffels M, Riedel K, Givskov M, Hartmann A, Langebartels C, Eberl L (2001) Visualization of N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Cell-Cell Communication between Bacteria Colonizing the Tomato Rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 67:5761–5770

Steindler L, Venturi V (2007) Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* 266:1–9

Stevens AM, Schuster M, Rumbaugh KP (2012) Working Together for the Common Good: Cell-Cell Communication in Bacteria. *J Bacteriol* 194:2131–2141

Strom SL (2008) Microbial Ecology of Ocean Biogeochemistry: A Community Perspective. *Science* 320:1043–1045

Suarez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Venturi V (2008) The new group of non-pathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. shares a conserved quorum-sensing system, which is tightly regulated by the RsaL repressor. *Microbiology* 154:2048–2059

Suárez-Moreno ZR, Devescovi G, Myers M, Hallack L, Mendonça-Previato L, Caballero-Mellado J, Venturi V (2010) Commonalities and Differences in Regulation of N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing in the Beneficial Plant-Associated Burkholderia Species Cluster. *Appl Environ Microbiol* 76:4302–4317

Sun S, Chen J, Li W, Altintas I, Lin A, Peltier S, Stocks K, Allen EE, Ellisman M, Grethe J, Wooley J (2011) Community cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research and Analysis: the CAMERA resource. *Nucleic Acids Res* 39:D546–D551

Sun J, Daniel R, Wagner-Döbler I, Zeng A-P (2004) Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol* 4:36

Sun S, Tay QXM, Kjelleberg S, Rice SA, McDougald D (2015) Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J* 9:1812–1820

Surette MG, Miller MB, Bassler BL (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci* 96:1639–1644

Swift S, Karlyshev AV, Fish L, Durant EL, Winson MK, Chhabra SR, Williams P, Macintyre S, Stewart GS (1997) Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *J Bacteriol* 179:5271–5281

Swift S, Winson MK, Chan PF, Bainton NJ, Birdsall M, Reeves PJ, Rees CED, Chhabra SR, Hill PJ, Throup JP, Bycroft BW, Salmond GPC, Williams P, Stewart GS a. B (1993) A novel strategy for the isolation of luxI homologues: evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol Microbiol* 10:511–520

T

Taga ME, Semmelhack JL, Bassler BL (2001) The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 42:777–793

Taguchi F, Ogawa Y, Takeuchi K, Suzuki T, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y (2006) A Homologue of the 3-Oxoacyl-(Acyl Carrier Protein) Synthase III Gene Located in the Glycosylation Island of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Regulates Virulence Factors via N-Acyl Homoserine Lactone and Fatty Acid Synthesis. *J Bacteriol* 188:8376–8384

Tahrioui A, Quesada E, Llamas I (2011) The hanR/hanI quorum-sensing system of *Halomonas anticariensis*, a moderately halophilic bacterium. *Microbiology* 157:3378–3387

Tait K, Hutchison Z, Thompson FL, Munn CB (2010) Quorum sensing signal production and inhibition by coral-associated vibrios. *Environ Microbiol Rep* 2:145–150

Tait K, Joint I, Daykin M, Milton DL, Williams P, Cámara M (2005) Disruption of quorum

sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ Microbiol* 7:229–240

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739

Tang K, Zhang X-H (2014) Quorum Quenching Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Mar Drugs* 12:3245–3282

Taylor MW, Schupp PJ, Baillie HJ, Charlton TS, Nys R de, Kjelleberg S, Steinberg PD (2004) Evidence for Acyl Homoserine Lactone Signal Production in Bacteria Associated with Marine Sponges. *Appl Environ Microbiol* 70:4387–4389

Teplitski M, Chen H, Rajamani S, Gao M, Merighi M, Sayre RT, Robinson JB, Rolfe BG, Bauer WD (2004) *Chlamydomonas reinhardtii* Secretes Compounds That Mimic Bacterial Signals and Interfere with Quorum Sensing Regulation in Bacteria. *Plant Physiol* 134:137–146

Thomson NR, Crow MA, McGowan SJ, Cox A, Salmond GPC (2000) Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol* 36:539–556

Throup JP, Camara M, Briggs GS, Winson MK, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, Stewart GSAB (1995) Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol Microbiol* 17:345–356

Todd JH, Atema J, Bardach JE (1967) Chemical communication in social behavior of a fish, the yellow bullhead (*Ictalurus natalis*). *Science* 158:672–673

Toulza E, Tagliabue A, Blain S, Piganeau G (2012) Analysis of the Global Ocean Sampling (GOS) Project for Trends in Iron Uptake by Surface Ocean Microbes. *PLoS ONE* 7:e30931

Turner JT (2015) Zooplankton fecal pellets, marine snow, phytodetritus and the ocean's biological pump. *Prog Oceanogr* 130:205–248

U

Uchiyama T, Miyazaki K (2009) Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr Opin Biotechnol* 20:616–622

Uroz S, Dessaux Y, Oger P (2009) Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 10:205–216

V

Valade E, Thibault FM, Gauthier YP, Palencia M, Popoff MY, Vidal DR (2004) The PmlI-PmlR Quorum-Sensing System in *Burkholderia pseudomallei* Plays a Key Role in Virulence and Modulates Production of the MprA Protease. *J Bacteriol* 186:2288–2294

Valiadi M, Iglesias-Rodriguez D (2013) Understanding Bioluminescence in Dinoflagellates—How Far Have We Come? *Microorganisms* 1:3–25

Van Mooy BAS, Hmelo LR, Sofen LE, Campagna SR, May AL, Dyhrman ST, Heithoff A, Webb EA, Momper L, Mincer TJ (2012b) Quorum sensing control of phosphorus acquisition in *Trichodesmium* consortia. *ISME J* 6:422–429

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y-H, Smith HO (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304:66–74

Venturi V (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* 30:274–291

Verma SC, Miyashiro T (2013) Quorum Sensing in the Squid-Vibrio Symbiosis. *Int J Mol Sci* 14:16386–16401

Veselova M a, Klein S, Bass IA, Lipasova VA, Metlitskaia AZ, Ovadis MI, Chernin LS, Khmel' IA (2008) [Quorum sensing systems of regulation, synthesis of phenazine antibiotics, and antifungal (corrected) activity in rhizospheric bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449]. *Genetika* 44:1617–1626

Vial L, Cuny C, Gluchoff-Fiasson K, Comte G, Oger PM, Faure D, Dessaux Y, Bally R, Wisniewski-Dyé F (2006) N-acyl-homoserine lactone-mediated quorum-sensing in *Azospirillum*: an exception rather than a rule. *FEMS Microbiol Ecol* 58:155–168

Visick KL, Foster J, Doino J, McFall-Ngai M, Ruby EG (2000) *Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *J Bacteriol* 182:4578–4586

W

Wagner-Döbler I, Thiel V, Eberl L, Allgaier M, Bodor A, Meyer S, Ebner S, Hennig A, Pukall R, Schulz S (2005) Discovery of Complex Mixtures of Novel Long-Chain Quorum Sensing Signals in Free-Living and Host-Associated Marine Alphaproteobacteria. *ChemBioChem* 6:2195–2206

Wahl M, Goecke F, Labes A, Dobretsov S, Weinberger F (2012) The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. *Aquat Microbiol* 3:292

Walters M, Sperandio V (2006) Autoinducer 3 and Epinephrine Signaling in the Kinetics of Locus of Enterocyte Effacement Gene Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 74:5445–5455

Wang J, Quan C, Wang X, Zhao P, Fan S (2011) Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N-acyl homoserine lactones. *Microb Biotechnol* 4:479–490

Wang L-H, Weng L-X, Dong Y-H, Zhang L-H (2004) Specificity and Enzyme Kinetics of the

Quorum-quenching N-Acyl Homoserine Lactone Lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem* 279:13645–13651

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191
Waters CM, Bassler BL (2005) QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:319–346

Webster NS, Wilson KJ, Blackall LL, Hill RT (2001) Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol* 67:434–444

Wei H-L, Zhang L-Q (2006) Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89:267–280

Wenbin N, Dejuan Z, Feifan L, Lei Y, Peng C, Xiaoxuan Y, Hongyu L (2011) Quorum-sensing system in *Acidithiobacillus ferrooxidans* involved in its resistance to Cu²⁺. *Lett Appl Microbiol* 53:84–91

White CE, Winans SC (2007) Cell–cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 362:1135–1148

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci* 95:6578–6583

Wietz M, Mansson M, Gotfredsen CH, Larsen TO, Gram L (2010) Antibacterial Compounds from Marine Vibrionaceae Isolated on a Global Expedition. *Mar Drugs* 8:2946–2960

Williams P (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153:3923–3938

Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 362:1119–1134
Winans SC (2002) Bacterial Esperanto. *Nat Struct Mol Biol* 9:83–84

Winzer K, Hardie KR, Burgess N, Doherty N, Kirke D, Holden MTG, Linforth R, Cornell KA, Taylor AJ, Hill PJ, Williams P (2002) LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiol Read Engl* 148:909–922

Winzer K, Hardie KR, Williams P (2002) Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! *Curr Opin Microbiol* 5:216–222

Withers H, Swift S, Williams P (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:186–193

Wuster A, Babu MM (2009) Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast. *Mol Biosyst* 6:134–141

Xavier KB, Bassler BL (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6:191–197

Xavier KB, Miller ST, Lu W, Kim JH, Rabinowitz J, Pelczer I, Semmelhack MF, Bassler BL (2007) Phosphorylation and Processing of the Quorum-Sensing Molecule Autoinducer-2 in Enteric Bacteria. *ACS Chem Biol* 2:128–136

Xu F, Byun T, Dussen H-J, Duke KR (2003) Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J Biotechnol* 101:89–96

Y

Yang M, Sun K, Zhou L, Yang R, Zhong Z, Zhu J (2009) Functional analysis of three AHL autoinducer synthase genes in *Mesorhizobium loti* reveals the important role of quorum sensing in symbiotic nodulation. *Can J Microbiol* 55:210–214

Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, Goldner M, Dessaux Y, Cámara M, Smith H, Williams P (2002) N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 70:5635–5646

Yilmaz P, Iversen MH, Hankeln W, Kottmann R, Quast C, Glöckner FO (2012) Ecological structuring of bacterial and archaeal taxa in surface ocean waters. *FEMS Microbiol Ecol* 81:373–385

Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ, Remington K, Eisen JA, Heidelberg KB, Manning G, Li W, Jaroszewski L, Cieplak P, Miller CS, Li H, Mashiyama ST, Joachimiak MP, Belle C van, Chandonia J-M, Soergel DA, Zhai Y, Natarajan K, Lee S, Raphael BJ, Bafna V, Friedman R, Brenner SE, Godzik A, Eisenberg D, Dixon JE, Taylor SS, Strausberg RL, Frazier M, Venter JC (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Expanding the Universe of Protein Families. *PLoS Biol* 5:e16

Z

Zan J, Choi O, Meharena H, Uhlson CL, Churchill MEA, Hill RT, Fuqua C (2015a) A solo luxI-type gene directs acylhomoserine lactone synthesis and contributes to motility control in the marine sponge symbiont *Ruegeria* sp. KLH11. *Microbiol Read Engl* 161:50–56

Zan J, Choi O, Meharena H, Uhlson CL, Churchill MEA, Hill RT, Fuqua C (2015b) A solo luxI-type gene directs acylhomoserine lactone synthesis and contributes to motility control in the marine sponge symbiont *Ruegeria* sp. KLH11. *Microbiology* 161:50–56

Zan J, Cicirelli EM, Mohamed NM, Sibhatu H, Kroll S, Choi O, Uhlson CL, Wysoczinski CL, Murphy RC, Churchill MEA, Hill RT, Fuqua C (2012) A Complex LuxR-LuxI Type Quorum Sensing Network in a Roseobacterial Marine Sponge Symbiont Activates Flagellar Motility and Inhibits Biofilm Formation. *Mol Microbiol* 85:916–933

Zan J, Fricke WF, Fuqua C, Ravel J, Hill RT (2011) Genome Sequence of *Ruegeria* sp. Strain KLH11, an N-Acylhomoserine Lactone-Producing Bacterium Isolated from the Marine Sponge *Mycale laxissima* ▽. *J Bacteriol* 193:5011–5012

Zan J, Liu Y, Fuqua C, Hill RT (2014) Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing in the *Roseobacter* Clade. *Int J Mol Sci* 15:654–669

Zhai C, Zhang P, Shen F, Zhou C, Liu C (2012) Does *Microcystis aeruginosa* have quorum sensing? *FEMS Microbiol Lett* 336:38–44

Zhang L-H, Dong Y-H (2004) Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* 53:1563–1571

Zhang Y, Gladyshev VN (2008) Trends in Selenium Utilization in Marine Microbial World Revealed through the Analysis of the Global Ocean Sampling (GOS) Project. *PLoS Genet* 4:e1000095

Zhang G, Zhang F, Ding G, Li J, Guo X, Zhu J, Zhou L, Cai S, Liu X, Luo Y, Zhang G, Shi W, Dong X (2012) Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in a methanogenic archaeon. *ISME J* 6:1336–1344

Zheng H, Zhong Z, Lai X, Chen W-X, Li S, Zhu J (2006) A LuxR/LuxI-Type Quorum-Sensing System in a Plant Bacterium, *Mesorhizobium tianshanense*, Controls Symbiotic Nodulation. *J Bacteriol* 188:1943–1949

Zhou H, Yao F, Roberts DP, Lessie TG (2003) AHL-deficient mutants of *Burkholderia ambifaria* BC-F have decreased antifungal activity. *Curr Microbiol* 47:174–179

Zimmer BL, May AL, Bhedi CD, Dearth SP, Prevatte CW, Pratte Z, Campagna SR, Richardson LL (2014) Quorum Sensing Signal Production and Microbial Interactions in a Polymicrobial Disease of Corals and the Coral Surface Mucopolysaccharide Layer. *PLoS ONE* 9:e108541

Annexes

Communications scientifiques liées à ce travail de thèse

Présentations orales

- **"Diversity, expression and effects of acyl-homoserine lactones in marine bacterial communities"** Congrès annuel des doctorants du Laboratoire Arago - Observatoire Océanologique. 14 mars 2013 Banyuls sur mer (66) France
- **"Etude du quorum sensing dans l'environnement marin par une approche métagénomique"** 6^{ème} Congrès de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM VI) 22-25 octobre 2013 Parent (63) France
- **"Diversity, expression and effects of acyl-homoserine lactones in marine bacterial communities"** Congrès annuel des doctorants de l'EDDV 392 16-18 octobre 2013 Roscoff (29) France
- **"Diversity of quorum sensing autoinducers in marine environments"** Congrès annuel des doctorants du Laboratoire Arago - Observatoire Océanologique. 15 avril 2014 Banyuls sur mer (66) France

Poster

- **"Bacterial cell-to-cell signalling pathways in the sea"** 15^{ème} Congrès de l'International Society of Microbial Ecology (ISME 15) 16-18 24-29 août 2014 Seoul, Corée du sud

Bacterial cell-to-cell signalling pathways in the sea

Margot Doberva^{1a}, Sophie Sanchez-Ferandin², Eve Toulza³, Yoan Ferandin¹, Philippe Lebaron¹, Raphaël Lami¹

¹Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06 CNRS, ¹USR 3579 LBBM, ²UMR 7232 BLOM, Laboratoire Arago Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls /mer, FRANCE

³UPVD Univ Perpignan, ³CNRS, UMR 5244, 2EI, 66860 Perpignan cedex 9, FRANCE

*Contact : margot.doberva@obs-banyuls.fr

Study context :

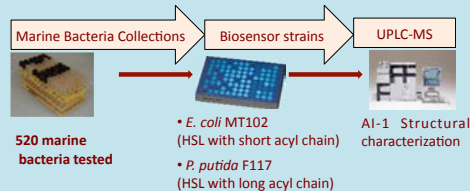
* Cell-to-cell signaling or **quorum sensing** is a density-dependent mechanism allowing bacteria to regulate and synchronize physiological activities.

* Autoinducers are small molecules that mediate the cell-to-cell signalling : - acyl-homoserinelactones (autoinducer-1 or **AI-1**) AI-1 synthases are encoded by *ainS*, *luxI* and *hdtS*.
- furanosyl diester borate (autoinducer-2 or **AI-2**) AI-2 synthases are encoded by *luxS*.

* Quorum sensing has been described in detail in a few model strains of biomedical and agronomic importance. By contrast, very little is known about the presence and importance of this mechanism in the natural environment and in particular in **marine ecosystems**.

What are the bacterial quorum sensing AI and AI synthases diversity in marine environment ?

Culture dependent approach :



Marine bacterial collection screening :
Among 520 strains screened for AI-1 production, **46 strains** were positive.

Origin of positive strains screened for AI-1 production :

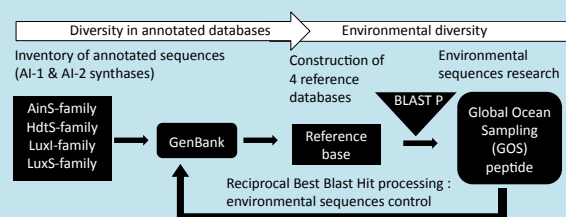
The 46 positive strains for AI-1 production were isolated in various oceans and marine habitats (sponges, water column, algae, lichens...).



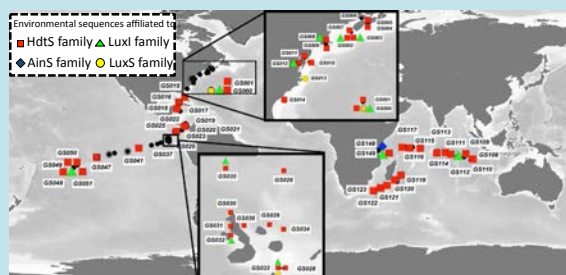
Genera	Species	Geographic location	F117	MT102
Maribius	pelagius	Pacific Ocean	+	
Marinovum	algicola	North Adriatic	+	
Roseibacterium	beibuensis	Sponge associated (Pacific Ocean)	+	
Thioclava	pacifica	Sponge associated (Pacific Ocean)	+	+
Croceicoccus	marinus	Mediterranean sea	+	+

Examples of marine bacteria genera in which quorum sensing has never been detected (AI-1).

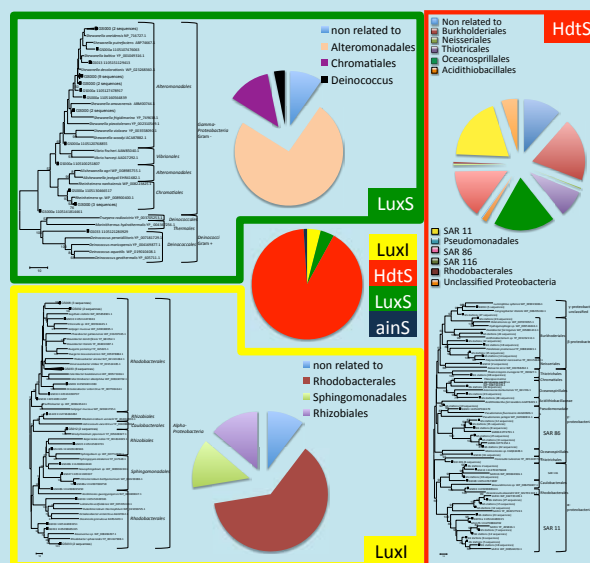
Culture independent approach :



Detection of environmental sequences related to AI synthases in the Global Ocean Sampling (GOS) metagenome.



Distribution of the 714 environmental sequences related to AI synthases through the GOS stations.



Affiliation of the 714 GOS environmental sequences related to AI-1 & AI-2 synthases families: This analysis shows the large taxonomic coverage of the marine sequences related to each families, and highlights new AI synthases marine sequences.

Conclusion:

Quorum sensing mechanisms may be more widespread in marine bacteria than suspected before:

- * Detection of **5 marine bacterial genera** in which quorum sensing has **never been detected (AI-1)** issued from different marine habitats and oceans (culture dependent approach).
- * **Diverse AI-1 & 2 synthases sequences found in all oceans** crossed by the GOS cruise and in various marine ecosystems (culture independent approach).

Acknowledgements:

- * ABIMS (Analysis and Bioinformatics for Marine Sciences) computational cluster
- * Community cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research and Analysis: the CAMERA resource
- * Funding: Emergence-UPMC

References :

- * Yooseph Shibui, et al. "The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Expanding the Universe of Protein Families." *PLoS Biol* (2007).
- * Gram, Lone, et al "Possible Quorum Sensing in Marine Snow Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by Roseobacter Strains Isolated from Marine Snow." *AEM* (2002).

Articles scientifiques originaux et de revue

- **Doberva M**, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Croue J, Suzuki M, Lebaron P, Lami R (2014) Genome Sequence of the Sponge-Associated *Ruegeria halocynthiae* Strain MOLA R1/13b, a Marine Roseobacter with Two quorum sensing-Based Communication Systems. *Genome Announcements* : 00998-14
- **Doberva M**, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Joux F, Lebaron P, Lami R (2014) Genome Sequence of *Maribius* sp. Strain MOLA 401, a Marine Roseobacter with a Quorum-Sensing Cell-Dependent Physiology. *Genome Announcements* :00997–14
- **Doberva M**, Lami R, Lebaron P, Sanchez-Ferandin S. Ecology and Diversity of Bioluminescent Marine Microorganisms. Review.

Published Genome Announcements

Original submission: August 26, 2014

Revised submission: September 6, 2014

Genome sequence of the sponge associated *Ruegeria halocynthiae* Strain MOLA R1/13b, a marine *Roseobacter* with two quorum sensing based communication systems

Margot Doberva^{1,2}, Sophie Sanchez-Ferandin^{3,4}, Yoan Ferandin^{1,2}, Laurent Intertaglia^{5,6}, Julie Croué^{1,2}, Marcelino Suzuki^{1,2}, Philippe Lebaron^{1,2}, Raphaël Lami^{1,2,#}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, USR 3579, LBBM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

² CNRS, USR3579, LBBM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

³ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR7232, BIOM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

⁴ CNRS, UMR7232, BIOM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

⁵ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMS 2348, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

⁶ CNRS, UMS2348, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

[#] Corresponding author: raphael.lami@obs-banyuls.fr

Running title: Genome of a sponge associated marine *Ruegeria*

Keywords: Marine Sponge, Quorum sensing, *Roseobacter*, Genome

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ABSTRACT

Ruegeria halocynthiae MOLA R1/13b is an alphaproteobacterium isolated from the Mediterranean Sea sponge *Crambe crambe*. We here report the genome sequence and its annotation, revealing the presence of quorum sensing genes. This is the first report of the full genome of a *Ruegeria halocynthiae* strain.

GENOME ANNOUNCEMENT

Ruegeria halocynthiae MOLA R1/13b (MOLA culture Collection; WDCM911 <http://collection.obs-banyuls.fr/index.php>) was isolated in 1:5 marine R2A agar (in 75% Seawater) at 20°C, from the sponge *Crambe crambe* collected on 20/01/2010 from a 12 m depth at the Bay of Banyuls (48° 28'823N - 3° 08'038 E, France). A major step in our isolation protocol is that sponge homogenates were acclimated for 24 h at 16°C with marine R2A added at a 1:200 final dilution, before strain isolation. Based on its 16S rRNA gene sequences, the strain is phylogenetically related to *Ruegeria halocynthiae* MA1-6 (99% sequence identity to 16SrRNA genes), and belongs to Rhodobacteraceae (Roseobacter clade).

The strain was cultivated in 100 ml of Marine Broth 2216 medium (BD, Difco, Sparks, MD) at 25°C over 48h. DNA was extracted using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-based method (1). Genome sequencing steps conducted by MrDNA platform (Texas) included fragmentation, ligation to sequencing adapters and purification. Following the amplification and denaturation steps, libraries were sequenced in a pool. A total of 50 ng of DNA were used to prepare the library using the Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina). Library insert size was determined by an Experion Automated Electrophoresis Station (Bio-Rad). The insert size of the libraries ranged from 300 to 850 bp (average 500bp). The library (12pM) was loaded (in a pool) to a 600 Cycles v3 Reagent cartridge (Illumina) and the sequencing was performed on a Miseq sequencer (Illumina) and de novo assembled

with NGEN v11 (DNASTAR, Inc). The genome was annotated using Prokka 1.7 (<http://www.vicbioinformatics.com/software/prokka.html>).

The sequence draft genome sequence of *Ruegeria halocynthiae* MOLA R1/13b is 4,320,292 bp, with a GC content of 58.3%, including 4205 coding sequences, 2 rRNA and 53 tRNAs. The genome annotation revealed the presence of genes involved in quorum sensing. Two autoinducer type 1 synthase homologous to *luxI*, and 6 corresponding *luxR* receptors (2) are detected in the genome. The genome annotation also revealed 3 genes encoding RhtB/lysE-like proteins, known to be involved in long chain homoserinelactones transmembrane transport (3). This is the first report of quorum sensing genes within the marine species *Ruegeria halocynthiae*. Thus, this draft genome reinforces previous observations suggesting that marine bacteria are able to communicate using quorum sensing in sponge micro-environments where these cells can be found at high concentrations (4,5)

Nucleotide sequence accession numbers. The whole-genome shotgun project has been deposited at DDJB/EMBL/GenBank under the accession no. JQEZ000000000.

REFERENCES

- (1) **Dempster EL, Pryor KV, Francis D, Young JE, Rogers HJ.**1999. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses. *Biotechniques* **27**: 66–68
- (2)**Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the luxR-luxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* **176**:269-275
- (3) **Zakataeva NP, Aleshin VV, Tokmakova IL, Troshin PV, Livshits VA.** 1999. The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Letters* **452**:228-232
- (4) **Vacelet J, Donadey C.** 1977. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J Exp Mar Biol Ecol* **30**:301–314
- (5) **Taylor MW, Schupp, PJ, Baillie HJ, Charlton TS, deNys R, Kjelleberg S, Steinberg PD** (2004) Evidence for acylhomoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges. *Appl Environ Microbiol* **70**:4387-4389

ACKNOWLEDGMENTS. This work was support by an UPMC-Emergence grant. We thank the Bio2Mar (<http://bio2mar.obs-banyuls.fr>) platform for access to instrumentation and to MrDNA (<http://www.mrdnalab.com>) for sequencing the genome.

Genome Sequence of the Sponge-Associated *Ruegeria halocynthiae* Strain MOLA R1/13b, a Marine *Roseobacter* with Two Quorum-Sensing-Based Communication Systems

Margot Doberva,^{a,b} Sophie Sanchez-Ferandin,^{c,d} Yoan Ferandin,^{a,b} Laurent Intertaglia,^{e,f} Julie Croué,^{a,b} Marcelino Suzuki,^{a,b} Philippe Lebaron,^{a,b} Raphaël Lami^{a,b}

Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, USR 3579, LBBM, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^a; CNRS, USR 3579, LBBM, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^b; Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR 7232, BIOM, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^c; CNRS, UMR 7232, BIOM, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^d; Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMS 2348, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^e; CNRS, UMS 2348, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^f

***Ruegeria halocynthiae* MOLA R1/13b is an alphaproteobacterium isolated from the Mediterranean sea sponge *Crambe crambe*. We report here the genome sequence and its annotation, revealing the presence of quorum-sensing genes. This is the first report of the full genome of a *Ruegeria halocynthiae* strain.**

Received 26 August 2014 Accepted 8 September 2014 Published 9 October 2014

Citation Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Croué J, Suzuki M, Lebaron P, Lami R. 2014. Genome sequence of the sponge-associated *Ruegeria halocynthiae* strain MOLA R1/13b, a marine *Roseobacter* with two quorum-sensing-based communication systems. *Genome Announc.* 2(5):e00998-14. doi:10.1128/genomeA.00998-14.

Copyright © 2014 Doberva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](#).

Address correspondence to Raphaël Lami, raphael.lami@obs-banyuls.fr.

Ruegeria halocynthiae MOLA R1/13b (MOLA culture collection no. WDCM911; see <http://collection.obs-banyuls.fr/index.php>) was isolated in 1:5 marine R2A agar (in 75% seawater) at 20°C, from the sponge *Crambe crambe* collected on 20 January 2010 from a 12-m depth at the Bay of Banyuls (48°28'823"N, 3°08'038"E, France). A major step in our isolation protocol is that sponge homogenates were acclimated for 24 h at 16°C with marine R2A added at a 1:200 final dilution, before strain isolation. Based on its 16S rRNA gene sequences, the strain is phylogenetically related to *Ruegeria halocynthiae* MA1-6 (99% sequence identity to 16SrRNA genes) and belongs to the *Rhodobacteraceae* (*Roseobacter* clade).

The strain was cultivated in 100 mL of marine broth 2216 medium (BD, Difco, Sparks, MD) at 25°C over 48 h. DNA was extracted using a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-based method (1). Genome sequencing steps conducted by MrDNA platform (Texas) included fragmentation, ligation to sequencing adapters, and purification. Following the amplification and denaturation steps, libraries were sequenced in a pool. A total of 50 ng of DNA was used to prepare the library using the Nextera DNA sample preparation kit (Illumina). Library insert size was determined by an Experion automated electrophoresis station (Bio-Rad). The insert size of the libraries ranged from 300 to 850 bp (average, 500 bp). The library (12 pM) was loaded (in a pool) to a 600 Cycles v3 Reagent cartridge (Illumina), and the sequencing was performed on a MiSeq sequencer (Illumina) and *de novo* assembled with NGEN v11 (DNASTAR, Inc). The genome was annotated using Prokka 1.7 (www.vicbioinformatics.com/software/prokka.shtml).

The sequence draft genome sequence of *Ruegeria halocynthiae* MOLA R1/13b is 4,320,292 bp, with a G+C content of 58.3%, including 4,205 coding sequences, 2 rRNAs, and 53 tRNAs. The genome annotation revealed the presence of genes involved in quorum sensing. Two autoinducer type 1 synthases homologous to *luxI* and 6 corresponding *luxR* receptors (2) are detected in the

genome. The genome annotation also revealed 3 genes encoding RhtB/lysE-like proteins, known to be involved in long chain homoserinelactones transmembrane transport (3). This is the first report of quorum-sensing genes within the marine species *Ruegeria halocynthiae*. Thus, this draft genome reinforces previous observations suggesting that marine bacteria are able to communicate using quorum sensing in sponge microenvironments where these cells can be found at high concentrations (4, 5).

Nucleotide sequence accession number. The whole-genome shotgun project has been deposited at DDJB/EMBL/GenBank under the accession no. JQEZ000000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a UPMC-Emergence grant.

We thank the Bio2Mar (<http://bio2mar.obs-banyuls.fr>) platform for access to instrumentation and to MrDNA (<http://www.mrdnalab.com>) for sequencing the genome.

We declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Dempster EL, Pryor KV, Francis D, Young JE, Rogers HJ. 1999. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses. *BioTechniques* 27:66–68.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176:269–275.
- Zakataeva NP, Aleshin VV, Tokmakova IL, Troshin PV, Livshits VA. 1999. The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett.* 452:228–232. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00625-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00625-0).
- Vacelet J, Donadey C. 1977. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 30:301–314. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(77\)90038-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(77)90038-7).
- Taylor MW, Schupp PJ, Baillie HJ, Charlton TS, de Nys R, Kjelleberg S, Steinberg PD. 2004. Evidence for acyl homoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4387–4389. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.7.4387-4389.2004>.

Genome sequence of *Maribius* sp. Strain MOLA 401, a marine *Roseobacter* with a quorum sensing cell dependent physiology

Margot Doberva^{1,2}, Sophie Sanchez-Ferandin^{3,4}, Yoan Ferandin^{1,2}, Laurent Intertaglia^{5,6},
Fabien Joux^{7,8}, Philippe Lebaron^{1,2}, Raphaël Lami^{1,2,#}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, USR 3579, LBBM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

² CNRS, USR3579, LBBM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

³ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR7232, BIOM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

⁴ CNRS, UMR7232, BIOM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

⁵ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMS 2348, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

⁶ CNRS, UMS2348, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France

⁷ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls-sur-Mer, France

⁸ CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls-sur-Mer, France

[#] Corresponding author: raphael.lami@obs-banyuls.fr

Keywords: *Roseobacter*, quorum sensing, Genome

Running title: Genome of a marine coastal *Maribius* bacteria

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ABSTRACT

Maribius sp. Strain MOLA401 is an alphaproteobacterium isolated from a coral reef lagoon located in New Caledonia, France. We report the genome sequence and its annotation which, interestingly, reveals the presence of genes involved in quorum sensing. This is the first report of a full genome within the genus *Maribius*.

GENOME ANNOUNCEMENT

Maribius sp. Strain MOLA401 (MOLA culture Collection; WDCM911 <http://collection.obs-banyuls.fr/index.php>) was isolated on December 3, 2004, at 4 m depth, from marine waters in the southwest lagoon of New Caledonia (France; 22°21.23' S/ 166°23.43' E). The sampling station was located between oligotrophic water near the coral barrier and mesotrophic waters in the near-shore environment subjected to terrestrial inputs and effluents from the city of Nouméa (146 000 inhabitants) (1). Based on its 16S rRNA gene sequences, the strain is phylogenetically related to *Maribius pelagius* B5-6^T (96% sequence identity of 16SrRNA genes) and belongs to Rhodobacteraceae (Roseobacter clade).

The strain was cultivated in 100 ml of Marine Broth 2216 medium (BD, Difco, Sparks, MD) at 25°C over 48h. DNA was extracted using a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-based method (2). Genome sequencing steps conducted by MrDNA (Texas) included fragmentation, ligation to sequencing adapters and purification. Following the amplification and denaturation steps, libraries were sequenced in a pool. A total of 50 ng of DNA were used to prepare the library, using the Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina). Library insert size was determined by an Experion Automated Electrophoresis Station (Bio-Rad). The insert size of the libraries ranged from 300 to 850 bp (average 500bp). The library (12pM) was loaded (in a pool) to a 600 Cycles v3 Reagent cartridge (Illumina) and the sequencing was performed on a Miseq sequencer (Illumina) and de novo assembled with

NGEN v11 (DNASTAR, Inc). The genome was annotated using Prokka 1.7 (<http://www.vicbioinformatics.com/software/prokka.html>).

The draft genome sequence of *Maribius* sp. Strain MOLA401 is 3,856,666 bp, with a GC content of 67.6%, including 3764 coding sequences, 1 rRNA and 50 tRNAs. The genome annotation revealed the presence of genes involved in quorum sensing. The autoinducer type 1 synthase homologous to *luxI*, and its corresponding receptor *luxR* (3) are located in the same operon. The genome annotation also revealed a gene encoding a RhtB-like protein, known to be involved in long chain homoserinelactones transmembrane transport (4). This is the first report of quorum sensing genes within the marine genus *Maribius*. Thus, this draft genome reinforces previous observations suggesting that marine bacteria are able to communicate using quorum sensing in micro-environments (5) where these cells can be found at high concentrations.

Nucleotide sequence accession numbers. The whole-genome shotgun project has been deposited at DDJB/EMBL/GenBank under the accession no. JQEY000000000

REFERENCES

- (1) **Conan P, Joux F, Torr  ton JP, Pujo-Pay M, Douki T, Rochelle-Newall E, Mari X.** 2008 Effect of solar radiation on bacterio- and phytoplankton activity in a large coral reef lagoon (southwest New Caledonia). *Aquatic Microbial Ecology* **52**:83-98
- (2) **Dempster EL, Pryor KV, Francis D, Young JE, Rogers HJ.**1999. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses. *Biotechniques* **27**: 66–68
- (3)**Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the luxR-luxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* **176**:269-275
- (4) **Zakataeva NP, Aleshin VV, Tokmakova IL, Troshin PV, Livshits VA.** 1999. The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Letters* **452**:228-232
- (5) **Hmelo LR, Mincer TJ, VanMooy BAS.** 2011. Possible influence of bacterial quorum sensing on the hydrolysis of sinking particulate organic carbon in marine environments. *Environmental Microbiology Reports* **3**:682-688

ACKNOWLEDGMENTS. This work was support by an UPMC-Emergence grant. We thank the Bio2Mar (<http://bio2mar.obs-banyuls.fr>) platform for access to instrumentation and to MrDNA (<http://www.mrdnalab.com>) for sequencing the genome.

Genome Sequence of *Maribius* sp. Strain MOLA 401, a Marine *Roseobacter* with a Quorum-Sensing Cell-Dependent Physiology

Margot Doberva,^{a,b} Sophie Sanchez-Ferandin,^{c,d} Yoan Ferandin,^{a,b} Laurent Intertaglia,^{e,f} Fabien Joux,^{g,h} Philippe Lebaron,^{a,b} Raphaël Lami^{a,b}

Sorbonne Universités, UPMC Université Paris, USR 3579, LBBM, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^a; CNRS, USR3579, LBBM, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France; Sorbonne Universités, UPMC Université Paris^b; UMR7232, BIOM, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^c; CNRS, UMR7232, BIOM, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^d; Sorbonne Universités, UPMC Université Paris, UMS 2348, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^e; CNRS, UMS2348, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^f; Sorbonne Universités, UPMC Université Paris, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^g; CNRS, UMR 7621, LOMIC, Observatoire Océanologique, Banyuls-sur-Mer, France^h

***Maribius* sp. strain MOLA401 is an alphaproteobacterium isolated from a coral reef lagoon located in New Caledonia, France. We report the genome sequence and its annotation which, interestingly, reveals the presence of genes involved in quorum sensing. This is the first report of a full genome within the genus *Maribius*.**

Received 26 August 2014 Accepted 28 August 2014 Published 2 October 2014

Citation Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Ferandin Y, Intertaglia L, Joux F, Lebaron P, Lami R. 2014. Genome sequence of *Maribius* sp. strain MOLA 401, a marine *Roseobacter* with a quorum-sensing cell-dependent physiology. *Genome Announc.* 2(5):e00997-14. doi:10.1128/genomeA.00997-14.

Copyright © 2014 Doberva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Raphaël Lami, raphael.lami@obs-banyuls.fr.

Maribius sp. strain MOLA401 (MOLA culture collection WDCM911 [<http://collection.obs-banyuls.fr/index.php>]) was isolated on 3 December 2004, at a 4-m depth, from marine waters in the southwest lagoon of New Caledonia (France) (22°21.23' S/166°23.43' E). The sampling station was located between oligotrophic water near the coral barrier and mesotrophic waters in the near-shore environment subjected to terrestrial inputs and effluents from the city of Nouméa (146,000 inhabitants) (1). Based on its 16S rRNA gene sequences, the strain is phylogenetically related to *Maribius pelagius* B5-6^T (96% sequence identity of 16S rRNA genes) and belongs to the *Rhodobacteraceae* (*Roseobacter* clade).

The strain was cultivated in 100 mL of marine broth 2216 medium (BD Difco, Sparks, MD) at 25°C for 48 h. DNA was extracted using a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-based method (2). Genome sequencing steps conducted by MrDNA (Texas) included fragmentation, ligation to sequencing adapters, and purification. Following the amplification and denaturation steps, libraries were sequenced in a pool. A total of 50 ng of DNA was used to prepare the library, using the Nextera DNA sample preparation kit (Illumina). The library insert size was determined by an Experion automated electrophoresis station (Bio-Rad). The insert sizes of the libraries ranged from 300 to 850 bp (average, 500 bp). The library (12 pM) was loaded (in a pool) to a 600-cycle v3 reagent cartridge (Illumina) and the sequencing was performed on a MiSeq sequencer (Illumina) and *de novo* assembled with NGEN v. 11 (DNASTAR, Inc.). The genome was annotated using Prokka 1.7 (3).

The draft genome sequence of *Maribius* sp. strain MOLA401 is 3,856,666 bp, with a GC content of 67.6%, including 3,764 coding sequences, 1 rRNA, and 50 tRNAs. The genome annotation revealed the presence of genes involved in quorum sensing. The autoinducer type 1 synthase homologous to *luxI*, and its corresponding receptor *luxR* (4) are located in the same operon. The genome annotation also revealed a gene encoding an RhtB-like

protein, known to be involved in long-chain homoserinelactone transmembrane transport (5). This is the first report of quorum-sensing genes within the marine genus *Maribius*. Thus, this draft genome reinforces previous observations suggesting that marine bacteria are able to communicate using quorum sensing in microenvironments (6) where these cells can be found at high concentrations.

Nucleotide sequence accession number. The whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number JQY000000000.

ACKNOWLEDGMENTS

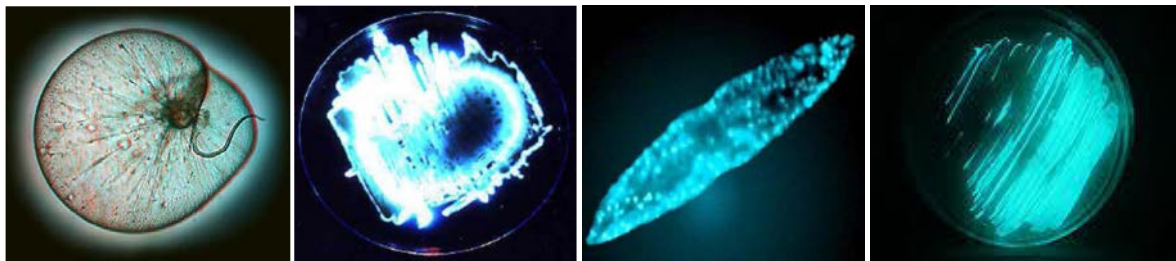
This work was supported by a UPMC Emergence grant.

We thank the Bio2Mar (<http://bio2mar.obs-banyuls.fr>) platform for access to instrumentation and to MrDNA for sequencing the genome.

REFERENCES

- Conan P, Joux F, Torréton JP, Pujo-Pay M, Douki T, Rochelle-Newall E, Mari X. 2008. Effect of solar ultraviolet radiation on bacterio- and phytoplankton activity in a large coral reef lagoon (southwest New Caledonia). *Aquat. Microb. Ecol.* 52:83–98. <http://dx.doi.org/10.3354/ame01204>.
- Dempster EL, Pryor KV, Francis D, Young JE, Rogers HJ. 1999. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses. *BioTechniques* 27: 66–68.
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the *luxR-luxI* family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176:269–275.
- Zakataeva NP, Aleshin VV, Tokmakova IL, Troshin PV, Livshits VA. 1999. The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett.* 452:228–232. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00625-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00625-0).
- Hmelo LR, Mincer TJ, VanMooy BA. 2011. Possible influence of bacterial quorum sensing on the hydrolysis of sinking particulate organic carbon in marine environments. *Environ. Microbiol. Rep.* 3:682–688. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00281.x>.

Ecology and diversity of bioluminescent marine micro-organisms



Noctiluca scintillans *Vibrio harveyi* *Pyrocystis fusiformis* *Photobactérium* sp.
(Poupin *et al* 1999)

Revue : Fundamental aspects of bioluminescence in marine microorganisms

Margot Doberva^{1,2}, Raphaël Lami^{1,2}, Philippe Lebaron^{1,2}, Sophie Sanchez-Ferandin^{3,4*}

¹ Université Pierre et Marie Curie Paris 06, USR 3579, LBBM, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls-sur-Mer, France

² Centre National de la Recherche Scientifique, USR 3579, LBBM, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls-sur-Mer, France

³ Université Pierre et Marie Curie Paris 06, UMR 7232 Biologie Intégrative des Organismes Marins (BIOM), Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls-sur-Mer, France

⁴ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7232 Biologie Intégrative des Organismes Marins (BIOM), Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls-sur-Mer, France

* corresponding author

Tel +33 4 6888 7356

Fax +33 4 6888 1699

E-mail sophie.sanchez-ferandin@obs-banyuls.fr

Short title: Bioluminescence in marine microorganisms

Keywords: bioluminescence; dinoflagellates; vibrios; symbiosis

ABSTRACT

Marine bioluminescence is produced by diverse organisms. Despite their small size, microorganisms are often responsible for intriguing large-scale bioluminescent phenomena such as the “shining seas” produced by plankton. Bioluminescence is present in a number of ecologically important microorganisms. Both eukaryotic and prokaryotic microorganisms are able to emit light, but they exhibit different patterns of geographical localization, lifestyle and bioluminescence regulation. In this review, we emphasize ecological traits and main regulation processes in bioluminescent dinoflagellates and bacteria. Laboratory experiments as well as the observation of these bioluminescent organisms in the natural environment provided clues about the ecological role of bioluminescence. Two main modes of bioluminescent regulation exist in these tiny organisms: most of eukaryotic plankton (mainly dinoflagellates) uses a circadian-controlled reaction that can vary slightly between species, whereas bacteria (vibrios) are known to use a quorum-sensing-controlled mechanism. Despite these differences, bioluminescence appears as an important component of the lifestyle of these marine microorganisms.

INTRODUCTION

Bioluminescence is the emission of visible light by organisms for an ecological function. It is a form of chemiluminescence requiring biological control of an enzyme, the luciferase, to catalyze an oxidation reaction (Wilson and Hastings 1998). Thus, bioluminescence differs from other sources of light emission such as fluorescence, phosphorescence and delayed luminescence by the chemical source of energy input. Historically, the discovery of bioluminescence occurred in three main consecutive periods: ancient observations, chemical characterization and molecular components identification (**Figure 38**). Bioluminescence in diverse marine organisms such as bacteria, dinoflagellates, radiolarians, ctenophores, cnidarians, annelids, molluscs, crustaceans and fishes, has been well studied (Herring 1987; Wilson and Hastings 1998; Haddock et al. 2010; Wilson and Hastings 2013). Bioluminescence is a widespread phenomenon that probably arose at least 40 times independently in the evolutionary history of life (Haddock et al. 2010). It is well known that bacteria play a crucial role in the functioning of marine ecosystems (Azam et al. 1983; Ducklow 1983) and in term of abundance, dinoflagellates are among the main eukaryotic groups (after diatoms) which actively participate to the food web chain (Jeong et al. 2010; Lovejoy et al. 2002). Bacteria and dinoflagellates are at the base of the aquatic food web, particularly connected to all aquatic life, and the occurrence of a similar bioluminescence phenomenon in these two unrelated groups is fascinating. The bioluminescence reaction rests on the luciferase (the enzyme) acting on its substrate, the luciferin. Amongst bioluminescent microorganisms, dinoflagellates and bacteria are the two groups for which our knowledge about bioluminescence is the most advanced, ranging from the discovery of luciferin and luciferase to the identification of *lux* operon gene order in bacteria (Meignen and Dunlap, 1993) and the deep study of luciferase genes structure in dinoflagellates (Liu and Hastings,

2007) (**Figure 38**). Nevertheless, to our knowledge, no existing literature intended to synthesize research on light emission in these two groups in a single review. Here, we decided to focus on dinoflagellates and bacteria, describing some of their lifestyles and the more recent advances in the understanding of this intriguing bioluminescence process. Although they are both unicellular marine organisms, bioluminescent bacteria exhibit various lifestyles (either in seawater or inside a host as symbionts) while bioluminescent dinoflagellates live as planktonic organisms. In addition, their mechanisms for controlling the bioluminescence reaction differ. Bioluminescence in most dinoflagellates shows strong circadian control (Johnson et al. 1984; Johnson et al. 1985) while bioluminescence in most bacteria is controlled by transcriptional regulation of the *lux* genes through a quorum-sensing process (Meighen and Dunlap 1993; Meighen 1991).

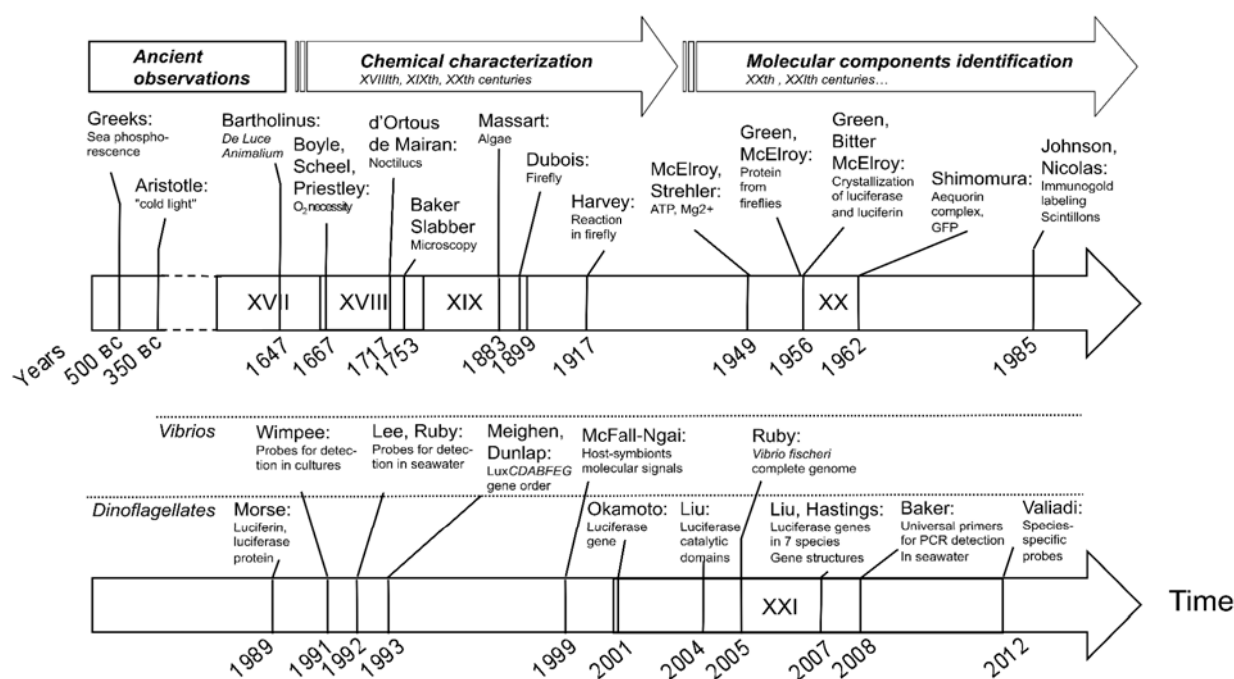


Figure 38 : Historical scale of the study of bioluminescence.

BIOLUMINESCENCE IN DINOFLAGELLATES

“Shining” sea and spatial distribution of bioluminescent dinoflagellates

Dinoflagellates are important primary producers participating in the carbon cycle (Slonczewski and Foster 2009) and also produce a significant portion of bioluminescence in all oceans (Morin 1983). Initially, bioluminescence phenomenon was previously found in 33 dinoflagellates species from nine distinct genera (Kelly and Katona 1966; Tett 1969; Tett 1971) and starting from the eighties, this number was progressively enlarged (Lapota and Losee 1984). Currently, 67 different species are classified as bioluminescent (Marcinko et al. 2013) and belong to 18 dinoflagellate genera known to have luminescent members (Baker et al. 2008) from the Dinophyceae and Noctiluiphyceae classes (**Tableau 10**). However, the exact number of bioluminescent dinoflagellates is still under debate. Several species were initially reported to be bioluminescent (Poupin et al. 1999) but recent investigations have failed to observe luminescence *in vitro*, and no luciferase gene amplification was obtained (Valiadi et al. 2012). This might be due to the luciferase gene sequence that is too divergent from the primers used for amplification, or to the previous identification of dinoflagellate species which was erroneous. In a recent study, Valiadi and co-workers showed that out of 34 tested dinoflagellate strains, 23 possessed the luciferase gene while only 18 were able to produce light in laboratory culture conditions (18 strains represented by 15 species in grey in **Tableau 10**) (Valiadi et al. 2012). This could be explained either by the lack or inability of the strain to express luciferin. An alternative explanation might be that laboratory conditions were not suitable for the expression of this process. Bioluminescent dinoflagellates are ubiquitously distributed in the upper ocean (Seliger et al. 1961; Yentsch and Laird 1968; Tett 1971; Tett and Kelly 1973; Staples 1966; Latz and Rohr 1999). Day/night variations in bioluminescence have frequently been described in the epipelagic zone (Utyushev et al. 1999), notably in the Mediterranean Sea and the North Atlantic (Ondercin et al. 1995;

Geistdoerfer and Cussatlegras 2001), in the northern and southern Sargasso Sea (Batchelder et al. 1992; Swift et al. 1983) and very recently in the Arctic polar zone during night (Berge et al. 2012). Dinoflagellate bioluminescence is seasonal in the temperate oceans and affected by regional environmental events like upwelling and rainstorms. The “disturbed water luminescence” seen in “breaking wave-crests” (Turner 1965) is particularly visible in turbulent water, for example in waves (Stokes et al. 2004), ships' wakes (Rohr et al. 2002) and around swimming animals (Rohr et al. 1998).

Tableau 10 : Up-to-date list of traditionally recognized bioluminescent Dinoflagellates.

This list contains the 67 species referenced by Marcinko and co-workers (Marcinko et al. 2013) (species in dark and light grey backgrounds). Dark grey background shows species for which bioluminescence was observed in laboratory conditions by Valiadi and co-workers (Valiadi et al. 2012). This list does not only contain species confirmed to be bioluminescent by laboratory studies and may contain species whose bioluminescence is still disputed. The phylogenetic classification from AlgaeBase website was used (<http://www.algaebase.org/>).

Class	Order	Family	Species name
DINOPHYCEAE	Peridinales	Pyrophacaceae	<i>Fragilidium heterolobum</i>
			<i>Pyrophacus horologium</i>
			<i>Pyrophacus stenii</i>
	Gonyaulacales	Ceratiaceae	<i>Ceratium breve</i>
			<i>Ceratium candelabrum</i>
			<i>Ceratium digitatum</i>
			<i>Ceratium furca</i>
			<i>Ceratium fusus</i>
			<i>Ceratium gibberum</i>
			<i>Ceratium horridum</i>
			<i>Ceratium lunula</i>
			<i>Ceratium tripos</i>
		Pyrocystaceae	<i>Dissodinium pseudolunula</i>
			<i>Pyrocystis acuta</i>
			<i>Pyrocystis fusiformis</i>
			<i>Pyrocystis hamulus</i>

		<i>Pyrocystis lanceolata</i>
		<i>Pyrocystis lunula</i>
		<i>Pyrocystis noctiluca</i>
		<i>Pyrocystis obtus</i>
		<i>Pyrocystis pseudonociluca</i>
		<i>Pyrocystis robusta</i>
	Goniodomaceae	<i>Alexandrium acatenella</i>
		<i>Alexandrium affine</i>
		<i>Alexandrium catenella</i>
		<i>Alexandrium fundyense</i>
		<i>Alexandrium monilatum</i>
		<i>Alexandrium ostenfeldii</i>
		<i>Alexandrium tamarense</i>
		<i>Pyrodinium bahamense</i>
		<i>Triadinium polyedricum</i>
	Protoceratiaceae	<i>Ceratocorys horrida</i>
	Gonyaulacaceae	<i>Gonyaulax catenata</i>
		<i>Gonyaulax digitalis</i>

		<i>Gonyaulax excavata</i>
		<i>Gonyaulax grindleyi</i>
		<i>Gonyaulax hyalina</i>
		<i>Gonyaulax monacantha</i>
		<i>Gonyaulax monilata</i>
		<i>Gonyaulax parva</i>
		<i>Gonyaulax polygramma</i>
		<i>Gonyaulax scrippsae</i>
		<i>Gonyaulax sphaeroida</i>
		<i>Gonyaulax spinifera</i>
		<i>Lingulodinium polyedrum</i>
		<i>Peridiniella catenata</i>
		<i>Protoceratium reticulatum</i>
	Peridiniaceae	<i>Glenodinium sp.</i>
		<i>Protoperidinium antarcticum</i>
		<i>Protoperidinium bipes</i>
		<i>Protoperidinium brevipes</i>
		<i>Protoperidinium brochii</i>
		<i>Protoperidinium cerasus</i>
		<i>Protoperidinium claudicans</i>

Protopteridinium conicoides

Protopteridinium conicum

Protopteridinium crassipes

Protopteridinium curtipes

Protopteridinium depressum

Protopteridinium divergens

Protopteridinium elegans

Protopteridinium eugrammum

Protopteridinium excentricum

Protopteridinium exiquestes

Protopteridinium globulum

Protopteridinium grahamii

Protopteridinium granii

Protopteridinium heteracanthus

Protopteridinium huberi

Protopteridinium leonis

Protopteridinium minutum

Protopteridinium nudum

Protopteridinium oceanicum

Protopteridinium ovatum

Protopteridinium pacificum

			<i>Proto-peridinium pallidum</i> <i>Proto-peridinium pellucidum</i> <i>Proto-peridinium pentagonum</i> <i>Proto-peridinium punctulatum</i> <i>Proto-peridinium pyriforme</i> <i>Proto-peridinium pyriforme</i> spp. <i>breve</i> <i>Proto-peridinium saltans</i> <i>Proto-peridinium sinaicum</i> <i>Proto-peridinium sournia</i> <i>Proto-peridinium steinii</i> <i>Proto-peridinium subinermis</i> <i>Proto-peridinium thulesense</i> <i>Proto-peridinium tuba</i>
	Gymnodiniales	Polykrikaceae	<i>Polykrikos kofoidii</i> <i>Polykrikos schwartzii</i>
NOCTILUCIPHYS CEAE	Noctilucales	Noctilucaceae	<i>Noctiluca scintillans</i>

Ecological function of bioluminescence

Several studies suggested that bioluminescence would confer ecological advantages for dinoflagellates (Esaías and Curl 1972; Buskey and Swift 1983; Tett and Kelly 1973; Porter and Porter 1979). One hypothesis is that in close or direct contact with a predator, bioluminescent emissions would reduce grazing impact on dinoflagellates, thus acting as a visual deterrent signal (Anderson et al. 1988). The dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* emits stronger bioluminescence signal in the presence of feeding copepods (Buskey et al. 1985), reducing predator grazing (Esaías and Curl 1972; White 1979) through disruption of feeding behaviour (Buskey and Swift 1983; Buskey et al. 1985; Maldonado and Latz 2007). In some cases, predators stop eating dinoflagellates and swim away from the light source (Buskey and Swift 1983). Following another hypothesis, bioluminescence in dinoflagellates could function as a “burglar alarm,” alerting visual predators to the presence of dinoflagellate grazers (Burkenroad 1943). At the highest concentrations, bioluminescent potential of dinoflagellates allows to highlight moving objects (Rohr et al. 1998; Latz and Rohr 2005). Thus, bioluminescence may help to attract secondary visual predators that consume the primary predators thereby acting as a protection of the bioluminescent dinoflagellates population. Several experimentations in laboratory conditions showed that the presence of bioluminescent dinoflagellates increases the mortality rate of predators grazing on them. For example, high mortality rates of copepods, eaten by sticklebacks (Abrahams and Townsend 1993) and high mortality rates of mysids, eaten by midshipman fish (Mensing and Case 1992) or by cuttlefish (Fleisher and Case 1995), were observed in the presence of dinoflagellate preys. In an opposite way, no evidence of “burglar alarm” was observed in the presence of *Lingulodinium polyedrum* (Cusick and Widder 2014). More precisely, it appears that the foraging efficiency and the orientation distance of a nocturnal teleost predator to its prey can vary depending on the bioluminescent dinoflagellate species present (Cusick and

Widder 2014). It clearly demonstrates that depending on species, bioluminescence probably has different roles that still need further investigations.

Three mostly studied bioluminescent species

Among bioluminescent dinoflagellates, three species (*Noctiluca scintillans*, *Lingulodinium polyedrum*, *Pyrocystis* sp.) are widely distributed and highly abundant.

Cells from *Noctiluca scintillans* species (“nox” for night, “lux” for light) are 1 mm-diameter spherical athecal algae that can form dense aggregates (Omori and Hamner 1982) and are often found at the sea surface. These cells are widely distributed in both temperate and warm waters and can be encountered in Gulf of California (Lapota and Losee 1984), Pacific Ocean (Liu and Wong 2006; Sriwoon et al. 2008), Indian Ocean and Arabian Sea (Lapota et al. 1988), Atlantic Ocean (Painting et al. 1993; Tiselius and Kiorboe 1998; Gil-Rodríguez et al. 2003) and in numerous European seas (Vilicic et al. 2002; Hållfors 2004; Uhlig and Sahlig 1990; Gómez 2003; Drits et al. 2013). The bioluminescent *N. scintillans* (formerly *N. miliaris*) species was found as the dominant dinoflagellate species (329 cells per litre) at the surface in the sea of Cortez (Lapota and Losee 1984). Biomass of *N. scintillans* populations has been estimated at 10,000–25,000 t Carbon during summer in German Bight corresponding to a density of 130-300 cells per litre (Uhlig and Sahlig 1990). However, concentrations up to 2,500 and 3,000 cells per litre have been observed at 0-5 and 20 meters depth respectively in the Benguela current area (Painting et al. 1993; Tiselius and Kiorboe 1998), and a density up to 40 millions of cells per litre was reached in the Black Sea (Drits et al. 2013). *Noctiluca scintillans* can rapidly change its buoyancy and its vertical distribution (Tiselius and Kiorboe 1998) probably by controlling cellular [ions](#) and [ammonia](#) concentrations.

Cells from *Lingulodinium polyedrum* species are warm water organisms notably found in California coast (Lapota et al. 1994), Atlantic Ocean (Gil-Rodríguez et al. 2003) and some European seas (Gómez 2003; Gómez and Boicenco 2004; Marasović 1989). Like other phytoplanktonic cells, this species is often responsible for massive blooms called red tides (Morales-Ramírez et al. 2001) sometimes resulting in fish and shellfish mortality events. *Lingulodinium polyedrum* cells are among the most abundant luminescent organisms in the coastal areas of southern California (Lapota et al. 1994; Latz and Rohr 1999) where they can be observed at night as luminescent waves breaking on the beach. During one of these events in the Adriatic Sea, concentrations up to 10 million cells per litre have been reported (Marasović 1989). They were also observed together with a variety of other bioluminescent dinoflagellates species (*Ceratium fusus*, *Protoperidinium*, *Dinophysis*, *Alexandrium*) in the Monterey Bay area (Shulman et al. 2012) with an observed swimming speed of 24 m per day (Smayda 2010). These cells are able to alter their swimming directions either due to turbulent conditions or in response to shear flow (Thomas and Gibson 1990; Karp-Boss et al. 2000).

Species from the *Pyrocystis* genus are distributed worldwide, with *P. lunula* for example localized in Atlantic Ocean (Gil-Rodríguez et al. 2003; Swift et al. 1983; Villareal et al. 2014), Adriatic and Black Seas (Vilicic et al. 2002; Gómez and Boicenco 2004) among others. One of these species, *P. noctiluca*, is known to have the greatest bioluminescent capacity of oceanic dinoflagellates (Swift et al. 1973; Tett and Kelly 1973). Compared to the other bioluminescent species, *Pyrocystis* cells are responsible for some of the most spectacular bioluminescence emissions and produced enough light to be detected by bathyphotometer in the Sargasso Sea (Swift et al. 1983).

Regulation of bioluminescence in dinoflagellates

General aspects

Diurnal rhythm of bioluminescence depends on day length, a phenomenon called "photo-entrainment". An increase in night time bioluminescence after higher day time light intensity was also reported, a phenomenon called "photo-enhancement" (Sweeney et al. 1959; Swift and Meunier 1976). For instance, increase of night time bioluminescence was observed in laboratory cultures of *Ceratium fusus* (Sullivan and Swift 1995), *L. polyedrum* (Sweeney et al. 1959), *Pyrocystis noctiluca* and *P. fusiformis* (Swift and Meunier 1976) and also more recently in natural populations (Marcinko et al. 2013). In this latter case, photo-enhancement can be modulated by mechanical stimulation, temperature or nutrients. Nutritional requirements are an important parameter in determining bioluminescent capacity (Sweeney 1971). Bioluminescence appears strongly linked with short-term nutritional status in heterotrophic dinoflagellates (Latz and Jeong 1993). When fed with the flagellate *Dunaliella*, the heterotroph *Noctiluca miliaris* (*N. scintillans* synonymous) emits more light than an unfed *Noctiluca* (Sweeney 1981b). In the same way, *Protoperdinium* species grown under growth-limiting food conditions have lower levels of bioluminescence than those grown at higher food concentrations and bioluminescence emission per cell is higher in the more rapidly growing cells (Buskey et al. 1994). Like swimming behaviour, photosynthesis and cell division, bioluminescence in most dinoflagellates responds to a circadian regulation (**Figure 39A**). Bioluminescence circadian rhythms follow different modes that are all not automatically present in each species: bright flashes, the intensity of which can vary on a circadian basis (Anderson et al. 1988) (**Figure 39A**, maximal in the middle of the night), low intensity glow (**Figure 39A**, just before dawn) (Hastings and Dunlap 1986; Johnson and Hastings 1986; Sweeney 1987) and spontaneous flash rhythm as in *L. polyedrum* (Krasnow et al. 1980; Lewis and Hallett 1997) and *Ceratocorys horrida* (Latz and Lee 1995). Mechanical stimulation produced by waves for example (cf. above) also induces bioluminescence in

dinoflagellates like *L. polyedrum* (Sweeney and Hastings 1957). Two main luminescence genes are an important component of the bioluminescence molecular functioning. The luciferase gene was first characterized in *Lingulodinium polyedrum* (Li et al., 1997; Bae and Hastings, 1994) and was found to exist in six other species (*Alexandrium affine*, *A. tamarense*, *Protoceratium reticulatum*, *Pyrocystis lunula*, *P. fusiformis* and *P. noctiluca*) (Liu et al., 2004). Inter-specific comparison revealed some luciferase sequence homologies (Liu and Hastings, 2005; Liu and Hastings, 2007; Liu et al., 2004; Okamoto et al., 2001). The luciferin binding protein is present in most of dinoflagellates investigated. Although bioluminescence in most dinoflagellates responds to a circadian regulation, the modalities of this circadian control can slightly vary between the different species as we will see below.

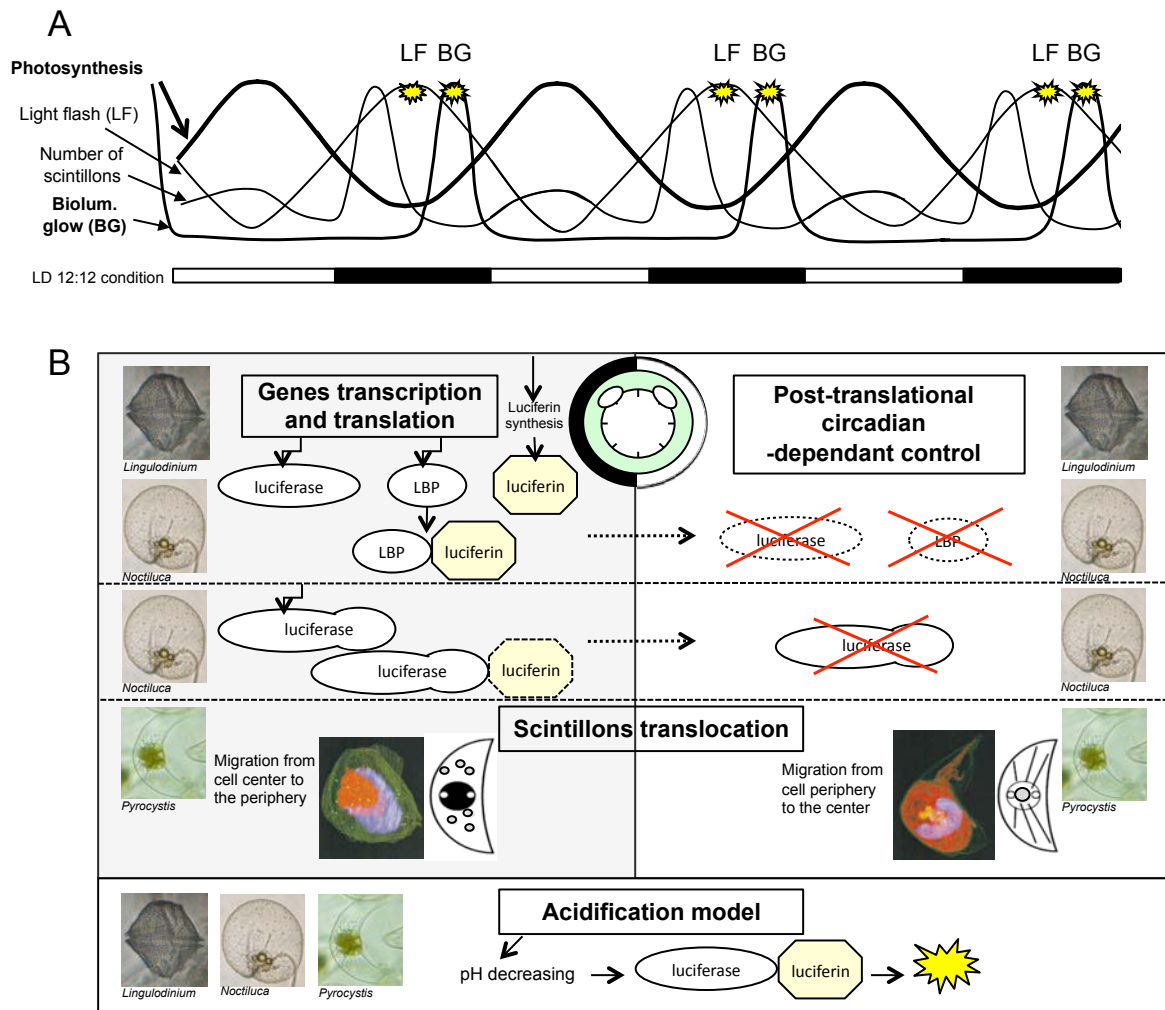


Figure 39 : Bioluminescent regulation in Dinoflagellate

(A) Physiological processes controlled by the endogenous clock in *Lingulodinium polyedrum* (summarized from (Lee 2008; Fritz et al. 1990)). Light flash (LF) corresponds to bright flashes for which flash peak intensity is about 10^9 quanta s^{-1} cell $^{-1}$. This light intensity is maximal in the middle of the night and minimal during the day. The second mode, the bioluminescent glow (BG) has a lower intensity (about 10^4 quanta s^{-1} cell $^{-1}$) and is maximal just prior to dawn. The circadian clock also controls photosynthesis but in an opposite way: for example, β -carotene level in *L. polyedrum* is two-fold higher at the middle of the day than during the night. LD 12:12 condition = 12 hours of light (L) followed by 12 hours of dark (D). White bars under the graphs represent day period and black bars represent night period. (B) Bioluminescence reaction in *L. polyedrum* and in *N. scintillans* is mainly controlled by post-translational circadian regulation (for *N. scintillans*, drawings represent the proposed involvement of independent LBP or LBP domain linked to the luciferase). In contrast, the rhythmic bioluminescence emission in *Pyrocystis lunula* is the result of scintillons translocation. Mechanical stimulation can also induce bioluminescence independently of the clock. Photographs from Seo and Fritz (Seo and Fritz 2000) and

<http://staff-www.uni-marburg.de/~cellbio/gallerie.html> (*P. lunula*);

<http://oceandatacenter.ucsc.edu/PhytoGallery/Dinoflagellates/lingulodinium.html> (*L. polyedrum*)

and <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/art98/nocti.html> (*N. scintillans*).

The dinoflagellate flash model

Scintillons are small cytoplasmic particles (“flashing units”) which possess the molecular elements involved in the emission of light, as previously shown in *Lingulodinium* and *Noctiluca* (Eckert 1966; Eckert and Reynolds 1967; DeSa and Hastings 1968; Hastings and Dunlap 1986; Nicolas et al. 1987a). Dinoflagellate bioluminescence systems operate with or without a luciferin binding protein, representing two distinct modes of light production (Valiadi and Iglesias-Rodriguez 2014). In *L. polyedrum* which has a separate luciferin binding protein, the mechanism of scintillon flashing involves a local acidification that both releases luciferin from its binding protein and activates luciferase resulting in light emission (**Figure 39B**) (Fogel and Hastings 1972). Bioluminescent flash production in *Noctiluca* species was particularly well studied by electrophysiology (Chang 1960; Hisada 1957). Remarkably, an additional luciferin binding gene which is not attached to luciferase was recently reported in *N. scintillans* (Valiadi and Iglesias-Rodriguez, 2014) further to its typical combined bioluminescence gene (binding domain in its luciferase sequence (Liu and Hastings 2007)). Mechanical stimulation induces an action potential which travels and depolarizes the membrane of the large central vacuole, the tonoplast, allowing a proton flux from the central vacuole to the scintillon membrane (Nawala and Sibaoka 1979; Widder and Case 1982). Action potentials were observed in *Noctiluca* (Eckert and Reynolds 1967; Eckert 1965; Eckert and Sibaoka 1968) and in *L. polyedrum*. In *L. polyedrum*, this propagated all-or-none action potential triggers a bioluminescent flash as proton entry in the scintillons induces a lower pH which not only activates luciferase (Krieger and Hastings 1968; Schmitter et al. 1976) but also causes the release of the substrate luciferin from the luciferin binding protein (Krieger and Hastings 1968; Morse et al. 1989; Fogel and Hastings 1971; Bode et al. 1963).

Interestingly, the only genus known to lack this luciferin binding protein is *Pyrocystis* (Knaust et al. 1998; Schmitter et al. 1976) but bioluminescence emission is possible with or without luciferin binding protein.

Clock control in *Lingulodinium polyedrum*

The timing of the strongest capacity of *L. polyedrum* cells to emit bioluminescence coincides with the strongest luciferin fluorescence (Johnson et al. 1985). Luciferin autofluorescence is more intense at the cell surface and periphery at night than during the day and this daily variation persists for at least 48 h under constant environmental conditions thus demonstrating the control by an endogenous circadian clock (Johnson et al. 1985). Scintillons, the location of the bioluminescence reaction, were localized by immunogold labeling (Johnson et al. 1985; Nicolas et al. 1991; Nicolas et al. 1987b). The number of scintillons peaks during the subjective night (**Figure 39A**) and drops sharply at the end of the night phase (time of maximal spontaneous bioluminescence). This suggests that the breakdown of scintillons is responsible for this circadian light emission (Hastings 1960; Fritz et al. 1990) as scintillons are broken down and reformed each day (Machabee et al. 1994). But it is not the only explanation. Some circadian regulated proteins in dinoflagellates are translated specifically during the dark phase, including nitrate reductase (Ramalho et al. 1995) and components of the bioluminescence reaction (Morse et al. 1989; Roenneberg and Mittag 1996). In each component of the bioluminescence reaction changes over time (**Figure 39B**): luciferase (Johnson et al. 1984), luciferin (Bode et al. 1963; Johnson et al. 1985) and probably luciferin binding protein as well (Sulzman et al. 1978). In *L. polyedrum*, luciferase and luciferin binding protein activities show circadian rhythm (McMurry and Hastings 1972; Sulzman et al. 1978) and they both undergo translational regulation (Morse et al. 1989). They are destroyed at the end of the night phase and then synthesized in the next cycle (**Figure**

39B) (Dunlap and Hastings 1981; Johnson et al. 1984) while their mRNA levels remain constant over the circadian cycle (Morse et al. 1989; Machabee et al. 1994).

Scintillon translocation in *Pyrocystis*

Species from the genus *Pyrocystis* have been extensively studied in the context of bioluminescence circadian rhythms (Swift et al. 1973; Sweeney 1979; Sweeney 1981b; Sweeney 1981a). Contrary to *Lingulodinium polyedrum*, no variation in luciferase amount was observed in extracts during day and night in *Pyrocystis* (Knaust et al. 1998) and no luciferin binding protein is present in any species of this genus (Schmitter et al. 1976). In *Pyrocystis* species, circadian rhythms of bioluminescence rather seem to correlate with rhythmic changes in bioluminescent organelles and plastids (Herman and Sweeney 1975; Sweeney 1981a; Colepiccolo et al. 1993; Seo and Fritz 2000). Scintillons of *Pyrocystis* (about 0.9 mm in diameter) are larger than those of *L. polyedrum* (about 0.5 mm in diameter) (Nicolas et al. 1987a) and do not appear to be degraded during the day. Instead, they are reported to relocate to the cell center during the day and migrate toward the cell periphery during the following evening. The plastids in *Pyrocystis* also exhibit circadian movement but in the opposite direction to the scintillons (Swift and Taylor 1967; Sweeney 1979). Plastids locate in the cell periphery during the day (pattern related to photosynthetic activity) and migrate toward the cell center during the night (**Figure 39B**). Heimann and co-workers suggested that F-actin and microtubules are involved in the movements of chloroplasts and scintillons (Heimann et al. 2009).

BIOLUMINESCENCE IN MARINE BACTERIA

Milky sea phenomenon and ecological function of bioluminescence

Bioluminescent bacteria are ubiquitous and abundant in the marine environment (Nealson and Hastings 1991), especially in temperate to warmer waters (Dunlap and Kita-Tsukamoto 2006). Unlike bioluminescence in most dinoflagellates which can be mechanically stimulated and under circadian control, luminescence from bacteria persists over 10 hours in a milky sea in the form of glowing (Lapota et al. 1988). Rather than an automatic functioning as in dinoflagellates, bacterial luminescence is under quorum-sensing control (see the section 2.2.2 for further details). Mostly observed during summer in the northwest Indian Ocean, milky sea seems to be restricted to the surface and is supposed to result from the activity of high concentrations of *Vibrio harveyi* (Lapota et al. 1988; Miller et al. 2005). These bacteria can live in close association with phytoplanktonic blooms like the microalga *Phaeocystis* that might provide nutrients (Miller et al. 2005; Nealson and Hastings 2006). However, the close interaction between microalgae and bioluminescent microorganisms can disadvantage bacteria in some cases. For example, in favourable growth conditions the planktonic marine alga *Fibrocapsa japonica* produces several bioactive compounds (haemolysins, neurotoxins and reactive oxygen species) that have a light-dependent inhibitory effect on *Vibrio fischeri*'s luminescence (van Rijssel et al. 2008). Luminescent bacteria can also colonize diverse kinds of marine particles, like faeces (Herren et al. 2004; Orzech and Nealson 1984). Interestingly, glowing bacteria are also able to attract predators, a highly unusual trait among such a non-parasitic system. Remarkably, zooplankton that contacts and feeds on the luminescent bacterium *Photobacterium leiognathi* start glowing and bright individuals become highly vulnerable to predation by nocturnal fish (Zarubin et al. 2012). Undigested bioluminescent bacteria are thus transferred from zooplankton guts to fish, where they thrive and gain a means for dispersal. Here again, bioluminescence appears highly beneficial for marine

bacteria, especially in food-deprived environments of the deep sea (Zarubin et al. 2012). Dimly glowing particles containing bacteria will also help retain bacteria in the upper water column if they are eaten. Otherwise, faecal pellets will sink to the sediment where the bacteria may die.

The taxonomy of bioluminescent bacteria

A single bioluminescent genus *Photobacterium* was initially proposed (Beijerinck 1889), but it became rapidly clear that this phenomenon concern very distinct physiological groups. First, publications regularly cleared up mistakes in bacteria identification (Chumakova et al. 1972; Hendrie et al. 1970; Reichelt and Baumann 1973). Based on certain nutritional and enzymatic properties (Lee 1972), luminous bacteria were classified in three main groups: *Photobacterium* (*Vibrio*) *fischeri* group, *P. phosphoreum* and *P. leiognathi* group, and *Beneckeia* (*Lucibacterium*) *harveyi*, *Beneckeia* (*Photobacterium*) *splendida*, and *Vibrio cholera* group (Hastings and Nealson 1977). A fourth cluster was also described, comprising the *Photobacterium mandapamensis* species, on the basis of overall phenotypic similarity (Reichelt and Baumann 1973). Nowadays, several genera including the five main genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Alteromonas*, *Xenorhabdus* and *Shewanella* (**Tableau 11**) (Haddock et al. 2010; Herring 1987; Makemson et al. 1997) are known to include bioluminescent bacteria. Most of them are marine organisms (Baumann et al. 1983; Meighen 1991) and only *Xenorhabdus* infects terrestrial organisms (Farmer et al. 1989). *Vibrio harveyi*, *V. fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *P. leiognathi*, and *Xenorhabdus luminescens* have been investigated in most detail (Meighen 1991). It is probable that the taxonomy of luminescent bacteria will evolve, as depending on studies, *Vibrio fischeri*, *V. logei* and *V. salmonicida* are placed in a new genus called *Allivibrio* (Urbanczyk et al. 2007; Verma and Miyashiro 2013). As for dinoflagellates, bioluminescent bacteria maintained under laboratory conditions

display an instability in their light-emitting capacity thus exhibiting “dark” variants (Beijerinck 1889; Beijerinck 1916) which do not lack the luciferase genes but express these genes at extremely low levels. Loss and gain of the capacity to transcribe the elements controlling bioluminescence could have an ecological importance. Interestingly, it would allow the species to enjoy two lifestyles and maintain the cell population able to form variants with a distinct physiology compatible with the demand of an alternate niche (Hastings and Nealson 1977). This phenomenon was early observed with non luminous K variants appearing and outgrowing the luminescent ones under some conditions (Keynan and Hastings 1961), a “repeated source of irritation” to the people who maintain culture collections of luminescent bacteria (Hastings and Nealson 1977). Over several hundred non luminescent *Vibrio*, 5% carried the luxA gene and completely dark isolates exhibit incomplete lux operons due to a variety of lesions, including an insertion sequence, point mutations and deletions (O’Grady and Wimpee 2008).

Tableau 11 : Up-to-date list of bioluminescent bacteria and their main life characteristics (Dunlap and Kita-Tsukamoto 2006; Haddock et al. 2010; McFall-Ngai 1999).

Order	Familly	Species name	Planktonic	Symbiotic
Vibrionales	Vibrionaceae	MARINE WATER		
		<i>Vibrio campbelli</i>	+	
		<i>Vibrio chagasii</i>	+	
		<i>Vibrio fischeri</i> *	+	+
		<i>Vibrio gigantis</i>	+	
		<i>Vibrio harveyi</i>	+	+
		<i>Vibrio logei</i> *	+	+
		<i>Vibrio orientalis</i>	+	
		<i>Vibrio salmonicida</i> *	+	
		<i>Vibrio splendidus</i>	+	
		<i>Vibrio vulnificus</i>	+	
		<i>Photobacterium aquimaris</i>	+	
		<i>Photobacterium kishitani</i>	+	
		<i>Photobacterium leiognathi</i>	+	+
		<i>Photobacterium leiognathi</i>	+	
		subsp. <i>mandapamensis</i>		
		<i>Photobacterium leiognathi</i>	+	
		subsp. <i>leiognathi</i>		
		<i>Photobacterium luminescens</i>	+	
		<i>Photobacterium phosphoreum</i>	+	+
-	-	FRESH WATER		
		<i>Vibrio cholerae</i>		
Alteromonadales	Shewanellaceae	MARINE WATER		
		<i>Shewanella woodyi</i>	+	+
	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas hanedai</i>	+	
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	TERRESTRIAL		
		<i>Xenorhabdus luminescens</i>		

*placed in a new genus called Aliivibrio (Urbanczyk et al. 2007; Verma and Miyashiro 2013)

Quorum sensing and lux-related light production

General aspects

Bacterial luminescence is under quorum-sensing control. Bioluminescent bacteria are not luminous until they reach sufficient high concentrations to initiate quorum-sensing (Nealson and Hastings 2006). Quorum-sensing is described as the capacity of bacteria to work synergistically and is used by many bacteria to detect the presence of other bacterial cells in their surroundings (for review see (Taga and Bassler 2003; Waters and Bassler 2005). It depends upon bacterial population density and is responsible for cells coordination. Its action goes beyond bioluminescence as quorum-sensing also regulates other processes (formation of biofilms, toxin emission...). A large number of bioluminescent bacteria communicate with homoserine lactones (HSL), and more particularly with acyl homoserine lactones (AHL) signals and possess LuxI and LuxR proteins (Manefield and Turner 2002). LuxR is required to activate transcription of the luciferase operon (Swartzman et al. 1992; Stevens et al. 1994). Genes coding for the bioluminescent process belong to the *lux* operon. The *lux* operon comprises genes coding for different subunits of either luciferase (A and B), fatty acid reductase complex of the luminescence system (C, D and E) or flavin reductase (G) (Dunlap and Kita-Tsukamoto 2001). The most common order found in luminous bacteria is *luxCDABEG*, except in some *Photobacterium* strains found in mid- or deep water that have an additional LuxF gene encoding a non-fluorescent flavoprotein in the *luxCDABFEG* operon (Meighen and Dunlap 1993; Meighen 1991) apparently not necessary for luminescence (Meighen and Dunlap 1993). The presence of LuxF in three different *P. phosphoreum* strains (Soly et al. 1988; Ast and Dunlap 2004) suggests that it might provide insight into speciation in luminous bacteria as it is absent in *P. leiognathi* species that is a symbiont of a shallow water fish (Lee et al. 1991).

Regulation of *Vibrio fischeri* bioluminescence by quorum sensing

In numerous species like *Vibrio fischeri*, the direct expression of the Lux operon is regulated by the LuxI-LuxR genetic system. A specific bacterial gene (LuxI) is continuously expressed and participates to the synthesis of a small molecule, the autoinducer (AI), that is continuously secreted and accumulates in the environment around bacterial cells (**Figure 40A**). The 3-oxo-C6-HSL molecule, synthesized from the LuxI enzyme (Engebrecht and Silverman 1984; Schaefer et al. 2008), freely diffuses through the cell membrane from the bacteria to the environment and is imported to adjacent bacterial cell by diffusion or active internalization (Kaplan and Greenberg 1985). Once it enters inside any bacterial cell, this AI can then be detected by a receptor protein also expressed and translated from the bacterial genome. The LuxR gene encodes for a DNA binding protein receptor that recognizes and binds to the 3-oxo-C6-HSL. As cell density increases, AI concentration increases in the surrounding medium, and when a given threshold concentration is reached, the target receptors partners can then activate gene expression to allow bioluminescence production (Withers et al. 2001; Bassler 2002). Once the AI is bound to the receptor, the expression of genes coding proteins involved in bioluminescence process (*lux* operon) is activated (**Figure 40A**). In *V. fischeri*, LuxR gene transcription is modulated by two additional systems, AinS-AinR and LuxS-LuxP/Q, which thus indirectly participate to luminescence regulation. More precisely, AinS-AinR and LuxS-LuxP/Q systems modulate the LuxR transcription via LitR (Fidopiastis et al. 2002) which promotes LuxR transcription. AinS produces another type of AI-1: N-octanoyl-homoserine lactone. This AI-1 binds to the receptor AinR (Kuo et al. 1996; Lupp et al. 2003) and also LuxR (Schaefer et al. 1996). The LuxP/Q-AI-2 complex allows the stabilisation of LitR transcript via another protein complex. It is well known that quorum-sensing regulates numerous important processes in bacteria. Among these, bioluminescence has a particular importance in marine environment, as it is almost exclusively found in marine bacteria that show different ecological strategies, being either planktonic or symbiotic (**Figure**

40B). Bacterial luminescence can be seen either in laboratory conditions, or in cells aggregating in small or large patches in oceans (on faeces, biofilms...) or in the organs of metazoans. In this latter case, bioluminescent bacteria interact and coordinate the bioluminescence process inside a metazoan host, illustrating the high complexity of natural interactions between marine organisms.

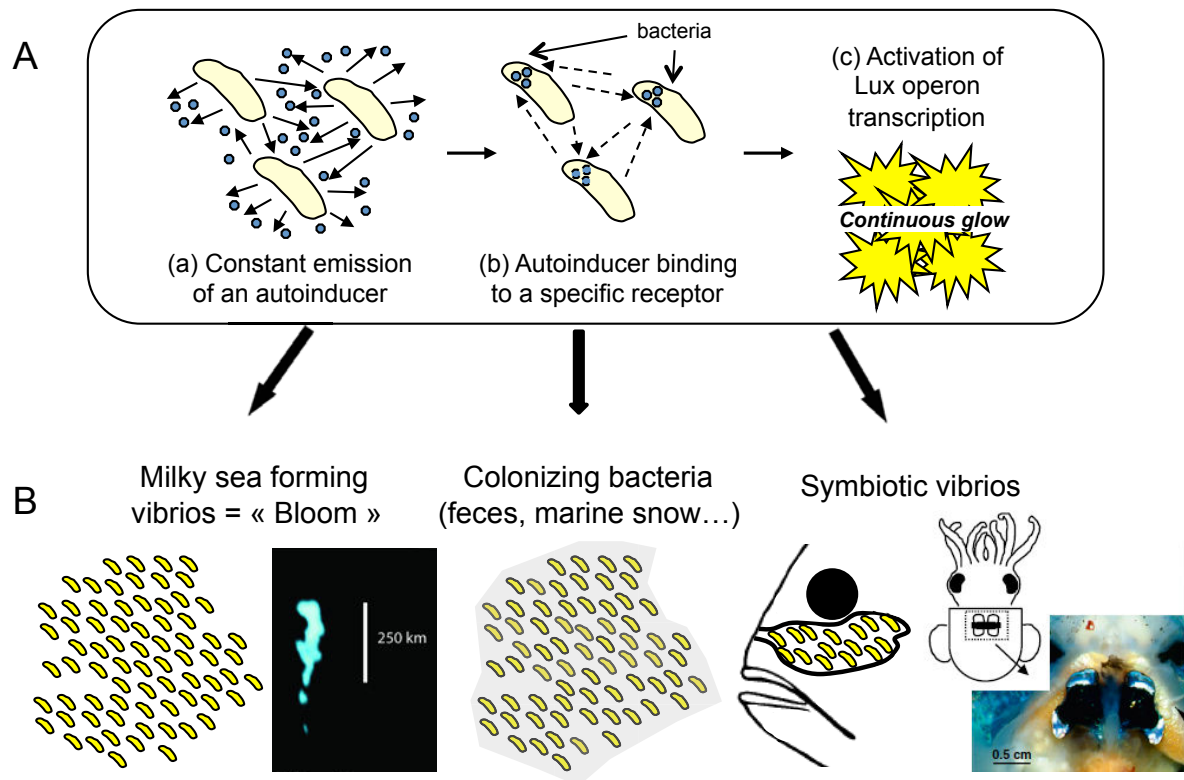


Figure 40 : Quorum sensing induces bioluminescence in planktonic and symbiotic *Vibrios*.

(A) Schematic steps of quorum-sensing: (a) the autoinducer (AI) is continuously synthesized, it diffuses across cell membranes and accumulates in the environment around the bacterial cells; (b) the AI is then detected by a “receptor”; (c) the expression of genes coding proteins involved in bioluminescence (Lux operon) are activated. (B) Association of bacteria in bioluminescent bloom formation, colonized marine particles and host organs. Milky sea near the coast of Somalia in the Indian Ocean (copyright: Steve Miller). Ventral view of *Euprymna scolopes* that reveals the position of the bilobed light organ in the mantle cavity (copyright: Margaret J. McFall-Ngai).

***Vibrio fischeri* versus *V. harveyi* bioluminescence regulation**

Initially well documented in *Vibrio fischeri* (Nealson et al. 1970), the bioluminescence phenomenon has been the focus of investigations mainly in this species and *V. harveyi*. The first AHL autoinducer was discovered in *Vibrio fischeri* and it appeared that the LuxI-LuxR system is essential for quorum-sensing control in this species. Although they exhibit autoinducers with very similar structure, homologous genes participating in the LuxI and LuxR synthesis were not detected in these two closely related species. Unlike *V. fischeri*, synthesis of AI-1 in *V. harveyi* is not dependant on a LuxI-like but on a LuxM protein. The *V. harveyi* quorum-sensing circuit possesses features reminiscent of both Gram-negative and Gram-positive quorum-sensing systems. In this species, both a homoserine lactone and a two-component signalling circuit analogous to that of Gram-positive bacteria coexist (Miller and Bassler 2001). Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum-sensing in this species (Tu and Bassler 2006). In addition, two parallel quorum-sensing processes exist to control the density-dependant expression of bioluminescence in *Vibrio harveyi* (Surette et al. 1999). In this species, the synthesis of AI-1 autoinducer (hydroxybutanoyl-L-homoserine lactone) is dependent on the LuxL/LuxM system (Bassler et al. 1993) while the synthesis of AI-2 autoinducer is dependent on LuxS, a gene with no homology to any other gene known to be involved in autoinducer production (Surette et al. 1999). LuxS synthesizes furanosyl-diester-borate also called AI-2 and this molecule is detected by LuxP a specific two-component sensor kinase membrane receptor (Neiditch et al. 2006). The AI-1 and AI-2 are detected by LuxN (and a periplasmic binding protein LuxP) and LuxQ respectively, that are two component proteins of the hybrid sensor class (Bassler et al. 1993; Bassler et al. 1994). Signalling from both sensors is channelled to a shared integrator protein called LuxU that relays the sensory information to the response regulator LuxO (which has a negative control on *luxCDABE*). In *V. harveyi*, at low cell density, LuxN and LuxQ indirectly repress *luxCDABE* expression and no light is produced

under these conditions. At high cell density, when LuxN and LuxQ interact with the autoinducers, they change to phosphatases that drain phosphate away from LuxO via LuxU. Thus, LuxO is unphosphorylated and inactive while LuxR binds the *luxCDABE* promoter and activates transcription (Engebrecht et al. 1983; Hanzelka and Greenberg 1995). The transcriptional activator LuxR in *V. harveyi* is not similar to the *V. fischeri* LuxR. Both *Vibrio harveyi* and *V. cholerae* species possess (in addition to LuxR) the LuxM/LuxN (for HA-1 autoinducer) and CqsA/CqsS (for CAI-1 autoinducer) quorum-sensing systems, but differences occur in the signals emitted as well as in the functioning of small RNAs involved in the process (Ng and Bassler 2009).

Surprisingly, no components similar to the LuxI/LuxR components of *V. fischeri* have ever been identified in *V. harveyi* although they are closely related *Vibrio* species and that the same target operons are regulated by quorum-sensing in both cases. However, the *ainS* gene (Gilson et al. 1995) similar to LuxM of *V. harveyi* has been found in *V. fischeri*. The AinS product directs the synthesis of a second *V. fischeri* AHL molecule (Hanzelka and Greenberg 1996; Kuo et al. 1996). The AinS protein does not have any homology to LuxI but the mechanism of biosynthesis of the AHL appears to be the same (Hanzelka et al. 1999). In addition, homologues of the *V. harveyi* LuxO and LuxU two-component proteins have been identified in *V. fischeri*. The genetic organization of the *luxOU* locus in *V. fischeri* is identical to that of *V. harveyi*, and furthermore, inactivation of *luxOU* in *V. fischeri* results in loss of repression of luminescence at low cell density. This phenotype is similar to the one determined in a *luxOU* mutant of *V. harveyi* (Miyamoto et al. 2000). These results indicate that the quorum-sensing system of *V. fischeri* could be much more complex than is currently thought and probably involves multiple signalling circuits similar to *V. harveyi* (Verma and Miyashiro 2013; Miyashiro and Ruby 2012).

Bioluminescent bacteria living in symbiosis

Vibrios - metazoan associations

Bioluminescent marine luminous bacteria exhibit a high flexibility in their ways of life with planktonic or symbiotic (light organ-symbiotic) forms. Some species have representatives living either inside or outside a host in natural environment like *Vibrio fischeri* cells that live either as free-living cells or as symbionts in association with eukaryotes in aquatic habitats (**Tableau 11**). Bioluminescent bacteria can live with different kinds of metazoan hosts including squids and fishes that are geographically widespread and play important roles in marine ecosystems. Members of at least 30 genera from 11 families of teleost fishes possess specialized light organs containing luminous bacteria, including anglerfishes, flashlight fishes, pinecone fishes from the Lophiiformes, Anomalopidae and Monocentridae respectively (Nealson and Hastings 1979). The species *V. fischeri* is typically involved in symbiosis with Monocentridae fishes, Sepiolidae and Loliginidae squids (even though the *V. fischeri* strains differ between the two families), while *Photobacterium leiognathi* and relatives are primarily symbionts for Leiognathidae, Apogonidae, and Moridae fishes (Kaeding et al. 2007). In contrast to teleosts, most luminous squids have their own chemical mechanisms of bioluminescence and only 2 families (Loliginidae and Sepiolidae) of the 19 luminous squid families contain genera that use luminous bacteria as the source of light (Nealson and Hastings 1979; Herring 1978). Among Sepiolidae, the symbioses involving Mediterranean (*Sepiola*) and Pacific (*Euprymna*) squid species probably evolved independently as they involve different vibrio species (Fidopiastis et al. 1998).

It was assumed in the past that closely related species of fish appear to carry the same bacterial species, for example *Photobacterium leiognathi* in the Leiognathidae (Bassot 1975; Hastings and Mitchell 1971; Reichelt et al. 1977) and some species inside Monocentridae (Hastings and Nealson 1977). But in numerous cases, there is not systematically a specific

association between luminous bacteria and a given host species. Four bacterial species were identified in bioluminescent symbiotic associations with fishes (*V. fischeri*, *V. logei* and *P. phosphoreum* and *P. leiognathi*) (Dunlap and Kita-Tsukamoto 2006) and three of them can also be symbionts of squids (**Tableau 11**) (McFall-Ngai 1999).

Bioluminescent bacterial symbionts can produce different light qualities, as illustrated by two sub-species of *P. leiognathi* (Ast and Dunlap 2004). Members of the *P. leiognathi subsp. mandapamensis* clade produce a shorter wavelength luminescence emission than members of the *P. leiognathi subsp. leiognathi* clade do (Ast and Dunlap 2004). These authors suggested a preferential association of *P. leiognathi subsp. mandapamensis* symbionts with host fishes at greater depths in the ocean rather than with the shallow-dwelling leiognathid fishes (Ast and Dunlap 2004). Other lines of evidence already suggested a preferential association depending on the depth. In support of this, luminescent symbionts of deep water fishes are primarily *P. phosphoreum* whereas luminescent bacteria found in fish in shallow and temperate waters are more commonly *P. leiognathi* or *V. fischeri* (Meighen 1991). Lastly, a given bacterial strain can either be an exclusive symbiont in some hosts or mixed with other bacteria in other hosts. The light organ of *Sepiola sp.* contains a mixed population of *V. logei* and *V. fischeri* species (Fidopiastis et al. 1998). While the light organs of most specimens of leiognathid fishes carry only *P. leiognathi subsp leiognathi* (Dunlap 1985; Dunlap et al. 2004; Reichelt et al. 1977; Dunlap et al. 2008), others harbour two sub-species of *P. leiognathi* together (Kaeding et al. 2007). The ecological significance of harbouring different bioluminescent strains is in these latter cases not completely understood.

Ecological consequences of host-symbiont interaction

Nowadays, the symbiosis between *Vibrio fischeri* and the hawaiian bobtail squid *Euprymna scolopes* is well characterized (McFall-Ngai and Ruby 1991; Ruby and McFall-Ngai 1992). The luminescence produced by the *V. fischeri* symbionts would help to

camouflage their host at night by eliminating its shadow within the water column (“counter-illumination”). This association shows a strong species specificity initiated within hours after the juvenile squid hatches provided that symbiotically competent *V. fischeri* cells are present in the ambient seawater (Ruby and Asato 1993; Ruby and McFall-Ngai 1992; Wei and Young 1989). The squid host *E. scolopes* acquires its *V. fischeri* luminescent symbionts from the surrounding seawater (Wei and Young 1989) in the same way as the fish host *Monocentris japonicus* (Dunlap and Kita-Tsukamoto 2006). Interestingly, the *E. scolopes-V. fischeri* model provided the first direct evidence of an animal host controlling the number of its extracellular bacterial population as part of a circadian biological rhythm. The *E. scolopes* and *Sepiola atlantica* hosts mechanically expell excess of *V. fischeri* symbionts periodically (Boettcher et al. 1996; Herring et al. 1981) thereby adjusting bacterial density inside the light organ (Ruby and Asato 1993). In the *V. fischeri-E. scolopes* symbiosis, the lowest production of bioluminescence (compared to the high night production) is observed just before dawn to early afternoon (Boettcher et al. 1996; Wier et al. 2010). This coincides with the onset of environmental light (Lee and Ruby 1994) and it thus exhibits many features of a circadian pattern (Boettcher et al. 1996; Heath-Heckman et al. 2013). By modulating either their abundance or their distribution in marine waters, the *E. scolopes-V. fischeri* symbiosis has a direct impact on the localization of the symbionts (Ruby and Lee 1998). In other cases, the expulsion of bacteria might affect the distribution of the hosts themselves. From the complete annotated genome of *V. fischeri* (Ruby et al. 2005) and the cDNA expression libraries for colonized and uncolonized *E. scolopes* light organs (Chun et al. 2006), numerous gene sequences encoding proteins known to be important for both development and symbiosis were obtained, like reflectin, actin, myeloperoxidase, aldehyde dehydrogenase and nitric oxid synthase (McFall-Ngai 1999; Chun et al. 2008). These findings confirm the molecular dialogue between host squid and bacterial symbionts at cell surfaces. Comparison of host and

symbiont population transcriptomes at four times over the day-night cycle (Wier et al. 2010) revealed maximum expression of cytoskeleton related genes just before dawn, concordant with the daily effacement of the host epithelium and a cyclic change in anaerobic metabolism of the symbionts (Wier et al. 2010). These host epithelium effacement and change in symbionts metabolism are clearly synchronized with the daily expulsion of most of the bacterial population (Boettcher et al. 1996; Ruby and Asato 1993). It is well known that during the colonization of the host tissue, the expression of sets of bacterial genes can be under the control of specific transcriptional regulators (Cotter and DiRita 2000), mainly described in bacteria that initiate pathogenic or benign infections (van Rhijn and Vanderleyden 1995). Interestingly, a mutant study showed that the gene *litR*, important for the normal induction of luminescence (see section 3.3.2. above), also plays a role as transcriptional regulator in modulating the ability of *V. fischeri* to colonize juvenile squid (Fidopiastis et al. 2002).

CONCLUSION

Different mechanisms underlie bioluminescence in diverse microorganisms. Concerning the two main eukaryotic and prokaryotic microorganisms kingdoms discussed here, many differences obviously occur between bioluminescent cells, depending on their way of living in the marine environment and the molecular components involved in the phenomenon. It is now well admitted that bioluminescence probably arose at least 40 times independently in the evolutionary history of life (Haddock et al. 2010) and the different modalities of bioluminescence expression and regulation found in a same family or genus of microorganisms tend to support this hypothesis. In bioluminescent dinoflagellates, although bioluminescence strictly depends on circadian rhythm, the process can differ slightly depending on species. This rhythm can either function endogenously by post-translational control of enzymes and substrates involved in the bioluminescence reaction during the night, or by circadian migration of scintillons inside the cell. In bacteria however, close interaction between cells enhances the secretion of an autoinducer that in turn activates the transcription of both enzyme and substrate involved in the reaction in a continuous manner, thus depending on cell density. However, even in closely related species like *Vibrio fischeri* and *V. harveyi*, showing adaptation to the same ecological niches, living freely in the oceans and seas or colonizing specific organs of identical multi-cellular hosts, the quorum-sensing systems controlling bioluminescence can differ and reveal complex multistep reaction processes. In addition, rather than by a biological clock depending mechanism, bioluminescence in bacteria depends on a cell concentration threshold.

From an ecological point of view, assessing the presence *in situ* of bioluminescence in the marine environment could be used as an indicator of the presence of dinoflagellates, including bioluminescent species (Kim et al. 2006). The recent advancements in the molecular techniques have enabled us to gain a better understanding of both the mechanism of

bioluminescence and the localization of the bioluminescent microbes. We have now access to methodologies allowing the detection of bioluminescent microorganisms thanks to the development of species-specific probes targeting the main genes involved in the bioluminescence process. Probes targeting the LuxA gene of major groups of luminescent bacteria have helped to identify luminescent bacteria in both laboratory cultures (Wimpee et al. 1991) and seawater samples (Lee and Ruby 1992). In the same way, “universal” primers targeting luciferase gene were designed for the development of PCR-oriented approaches to specifically detect bioluminescent dinoflagellates in environmental waters samples (Baker et al. 2008; Valiadi et al. 2014). In addition, the increasing amount of molecular data accumulated through diverse sea expeditions would permit to have a better idea of the geographical repartition of bioluminescent dinoflagellates and bacteria by metagenomics libraries screening, an approach recently used to detect quorum-sensing genes of marine bacteria (Doberva et al. 2015). In addition, it is noteworthy that there are numerous reports of both toxic and bioluminescent species occurring across the globe, like in Baltic Sea and United States for example (Kremp et al. 2009; Jester et al. 2009). Development of species-specific probes targeting the main genes involved in the luminescent process would thus be helpful to assess the *in situ* localization of harmful species. Environmental quality monitoring is also one of the current applications of bioluminescence from microorganisms. Naturally bioluminescent bacteria and dinoflagellates are invaluable for ecotoxicological tests, through the Microtox bioassay (Bulich 1979) available since 1990 and known as a commonly accepted method in ecotoxicity assessments (Johnson 2005), and the ASTM approved QwikLite bioassay (Lapota et al. 2007) respectively. Thanks to the accumulated and gained knowledge about the bioluminescence phenomenon, naturally produced bioluminescence from microorganisms is now used in a wide range of applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Emergence UPMC grant for the Margot Doberva PhD. Many thanks to Nigel Grimsley from the BIOM laboratory (OOB, France) and to three anonymous lecturers, for their thoughtful and constructive advices to improve the manuscript. Thanks to Stéphane Blain (LOMIC, OOB, France) for general support.

REFERENCES

- Abrahams MV, Townsend LD (1993) Bioluminescence in dinoflagellates: a test of the burglar alarm hypothesis. *Ecology* 74:258-260
- Anderson DM, Nosenchuck DM, Reynolds GT, Walton AJ (1988) Mechanical stimulation of bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein. *J Exp Mar Biol Ecol* 122:277-288
- Ast JC, Dunlap PV (2004) Phylogenetic analysis of the lux operon distinguishes two evolutionarily distinct clades of *Photobacterium leiognathi*. *Arch Microbiol* 181:352-361
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257-263
- Baker A, Robbins I, Moline MA, Iglesias-Rodriguez MD (2008) Oligonucleotide Primers for the Detection of Bioluminescent Dinoflagellates Reveal Novel Luciferase Sequences and Information on the Molecular Evolution of this Gene. *Journal of Phycology* 44:419-428
- Bassler B, Wright M, Silverman M (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol* 13:273-286
- Bassler BL (2002) Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell* 109:421-424
- Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* 9 (4):773-786
- Bassot JM (1975) Les organes lumineux à bactéries symbiotiques de quelques téléostéens léiognathides. *Arch Zool Exp Gen* 116:359-373
- Batchelder HP, Swift E, Van Keuren JR (1992) Diel patterns of planktonic bioluminescence in the northern Sargasso Sea. *Mar Biol* 113:329-339
- Baumann P, Baumann L, Woolkalis M, Bang S (1983) Evolutionary relationships in *Vibrio* and *Photobacterium*. A basis for a natural classification. *Annu Rev Microbiol* 37:369-398
- Beijerinck MW (1889) Les bactéries lumineuses dans leurs rapports avec l'oxygene. *Archives neerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles* 23:401-427
- Beijerinck MW (1916) Die leuchtbakterien der nordsee im august und september. *Folia Microbiol Delft* 4:15-40
- Berge J, Batnes AS, Johnsen G, Blackwell SM, Moline MA (2012) Bioluminescence in the high Arctic during the polar night. *Mar Biol* 159:231-237

- Bode VC, De Sa R, Hastings JW (1963) Daily rhythm in luciferin activity in *Gonyaulax polyedra*. *Science* 141:913-915
- Boettcher KJ, Ruby EG, McFall-Ngai MJ (1996) Bioluminescence in the symbiotic squid *Euprymna scolopes* is controlled by a daily biological rhythm. *J Comp Physiol A* 179:65-73
- Bulich A (1979) Use of Luminescent Bacteria for Determining Toxicity in Aquatic Environments. In: Markings LL, Kimerle RA (eds), *Aqua Toxicol*, ASTM 667, 98-106.
- Burkenroad MD (1943) A possible function of bioluminescence. *Journal of Marine Research* 5:161-164
- Buskey E, Coulter C, Brown S (1994) Feeding, growth and bioluminescence of the heterotrophic dinoflagellate *Protoperidinium huberi*. *Mar Biol* 121:373-380
- Buskey EJ, Reynolds GT, Swift E, Walton AJ (1985) Interactions between copepods and bioluminescent dinoflagellates: direct observations using image intensification. *Biol Bull* 169:530
- Buskey EJ, Swift E (1983) Behavioral responses of the coastal copepod *Acartia hudsonica* (Pinhey) to stimulated dinoflagellate bioluminescence. *J Exp Mar Biol Ecol* 72:43-58
- Chang J (1960) Electrophysiological studies of a non-luminescent form of the dinoflagellate *Noctiluca miliaris*. *J Cell Comp Physiol* 56:33-42
- Chumakova R, Vaniushin B, Kokurina N, Vorob'eva T, Medvedeva S (1972) [DNA composition and taxonomy of luminous bacteria]. *Microbiology USSR* 41 (4):613-620
- Chun C, Scheetz T, Bonaldo MF, Brown B, Clemens A, Crookes-Goodson W, Crouch K, DeMartini T, Eyestone M, Goodson M, Janssens B, Kimbell J, Koropatnick T, Kucaba T, Smith C, Stewart J, Tong D, Troll J, Webster S, Winhall-Rice J, Yap C, Casavant T, McFall-Ngai M, Soares M (2006) An annotated cDNA library of juvenile *Euprymna scolopes* with and without colonization by the symbiont *Vibrio fischeri*. *BMC Genomics* 7:154
- Chun CK, Troll JV, Koroleva I, Brown B, Manzella L, Einat S, Almabrazi H, Scheetz TE, de Fatima Bonaldo M, Casavant TL, Bento Soares M, Ruby EG, McFall-Ngai MJ (2008) Effects of colonization, luminescence, and autoinducer on host transcription during development of the squid-vibrio association. *PNAS* 105 (32):11323-11328
- Colepiccolo P, Roenneberg T, Morse D, Taylor WR, Hastings JW (1993) Circadian regulation of bioluminescence in the dinoflagellate *Pyrocystis lunula*. *J Phycol* 29:173-179
- Cotter PA, DiRita VJ (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* 54:519-565
- Cusick KD, Widder EA (2014) Intensity differences in bioluminescent dinoflagellates impact foraging efficiency in a nocturnal predator. *Bull Mar Sci* 90 (3):797-811

- DeSa R, Hastings JW (1968) The characterization of scintillons. Bioluminescent particles from the marine dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. J Gen Physiol:105-122
- Doberva M, Sanchez-Ferandin S, Toulza E, Lebaron P, Lami R (2015) Diversity of quorum sensing autoinducer synthases in the Global Ocean Sampling metagenomic database. Aquatic Microbial Ecology 74:107-119
- Drits AV, Nikishina AB, Sergeeva VM, Solov'ev KA (2013) Feeding, Respiration, and Excretion of the Black Sea *Noctiluca scintillans* MacCartney in Summer. Oceanology 53 (4):442-450
- Ducklow HW (1983) Production and fate of bacteria in the oceans. Bioscience 33:494–501
- Dunlap JC, Hastings JW (1981) The biological clock in *Gonyaulax* controls luciferase activity by regulating turnover. J Biol Chem 256:10509-10518
- Dunlap PV (1985) Osmotic control of luminescence and growth in *Photobacterium leiognathi* from ponyfish light organs. Arch Microbiol 141:44-50
- Dunlap PV, Davis KM, Tomiyama S, Fujino M, Fukui A (2008) Developmental and microbiological analysis of the inception of bioluminescent symbiosis in the marine fish *Nucchequula nuchalis* (Perciformes: Leiognathidae). Appl Environ Microbiol 74 (24):7471-7481
- Dunlap PV, Jiemjit A, Ast JC, Pearce MM, Marques RR, Lavilla-Pitogo CR (2004) Genomic polymorphism in symbiotic populations of *Photobacterium leiognathi*. Environ Microbiol 6:145-158
- Dunlap PV, Kita-Tsukamoto K (2001) Luminous bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) The prokaryotes, an evolving electronic resource for the microbiological community, Ch 329, Academic, New York
- Dunlap PV, Kita-Tsukamoto K (2006) Luminous Bacteria. Prokaryotes 2:863-892
- Eckert R (1965) Bioelectric control of bioluminescence in the dinoflagellate *Noctiluca*. II. Asynchronous flash initiation by a propagated triggering potential. Science 147:1142-1145
- Eckert R (1966) Excitation and luminescence in *Noctiluca miliaris*. In: Bioluminescence in Progress, Princeton University Press, Princeton Johnson and Haneda (eds):269
- Eckert R, Reynolds GT (1967) The subcellular origin of bioluminescence in *Noctiluca miliaris*. J Gen Physiol:1429-1458
- Eckert R, Sibaoka T (1968) The flash-triggering action potential of the luminescent dinoflagellate *Noctiluca*. J Gen Physiol 52:258-282
- Engbrecht J, Neilson K, Silverman M (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. Cell 32:773-778

- Engebrecht J, Silverman M (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. PNAS 81:4154-4158
- Esaias WE, Curl HC (1972) Effect of dinoflagellate bioluminescence on copepod ingestion rates. Limnol Oceanogr 17:901-905
- Farmer JJr, Jorgensen JH, Grimont PA, Akhurst RJ, Poinar GOJ, Ageron E, Pierce GV, Smith JA, Carter GP, Wilson KL (1989) *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. J Clin Microbiol 27:1594-1600
- Fidopiastis PM, Boletzky SV, Ruby EG (1998) A new niche for *Vibrio logei*, the predominant light organ symbiont of squids in the genus *Sepiola*. J Bacteriol 180:59-64
- Fidopiastis PM, Miyamoto CM, Jobling MG, Meighen EA, Ruby EG (2002) LitR, a new transcriptional activator in *Vibrio fischeri*, regulates luminescence and symbiotic light organ colonization. Mol Microbiol 45 (1):131-143
- Fleisher KJ, Case JF (1995) Cephalopod predation facilitated by dinoflagellate luminescence. Biol Bull 189:263-271
- Fogel M, Hastings J (1971) A substrate-binding protein in the *Gonyaulax* bioluminescence reaction. Arch Biochem Biophys 142:310-321
- Fogel M, Hastings JW (1972) Bioluminescence: mechanism and mode of control of scintillon activity. PNAS 69:690-693
- Fritz L, Morse D, Hastings JW (1990) The circadian bioluminescence rhythm of *Gonyaulax* is related to daily variations in the number of light-emitting organelles. Journal of Cell Science 95:321-328
- Geistdoerfer P, Cussatlegras A-S (2001) Variations nyctémérales de la bioluminescence marine en Méditerranée et dans l'Atlantique nord-est. CR Acad Sci Paris 324:1037-1044
- Gil-Rodríguez MC, Haroun R, Ojeda Rodríguez A, Berecibar Zugasti E, Domínguez Santana P, Herrera Morán B (2003) Proctoctista. In: Lista de especies marinas de Canarias (algas, hongos, plantas y animales) Las Palmas: Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias, Moro, Martín, Garrido & Izquierdo, I (eds):5-30
- Gilson L, Kuo A, Dunlap P (1995) AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. J Bacteriol 177:6946-6951
- Gómez F (2003) Checklist of Mediterranean free-living Dinoflagellates. Botanica Marina 46:215-242
- Gómez F, Boicenco L (2004) An annotated checklist of dinoflagellates in the Black Sea. Hydrobiologia 517:43-59

- Haddock SHD, Moline MA, Case JF (2010) Bioluminescence in the Sea. Annual Review of Marine Science 2:443-493
- Hällfors G (2004) Checklist of Baltic Sea phytoplankton species (including some heterotrophic protistan groups). Baltic Sea Environment Proceedings 95:1-208
- Hanzelka B, Greenberg E (1995) Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. J Bacteriol 177:815-817
- Hanzelka BL, Greenberg EP (1996) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. J Bacteriol 178:5291-5294
- Hanzelka BL, Parsek MR, Val DL, Dunlap PV, Cronan JEJ, Greenberg EP (1999) Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. J Bacteriol 181:5766-5770
- Hastings JW (1960) Biochemical aspects of rhythms: phase shifting by chemicals. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 25:131-143
- Hastings JW, Dunlap JC (1986) Cell-free components in dinoflagellate bioluminescence: The particulate activity: scintillons; the soluble components: luciferase, luciferin, and luciferin binding protein. Meth Enzym 133:307-323
- Hastings JW, Mitchell G (1971) Endosymbiotic bioluminescent bacteria from the light organ of pony fish. Biol Bull 141:261-268
- Hastings JW, Nealson KH (1977) Bacterial bioluminescence. Ann Rev Microbiol 31:S49-49S
- Heath-Heckman EA, Peyer SM, Whistler CA, Apicella MA, Goldman WE, McFall-Ngai MJ (2013) Bacterial bioluminescence regulates expression of a host cryptochrome gene in the squid-vibrio symbiosis. MBio 4 (2)
- Heimann K, Klerks PL, Hasenstein KH (2009) Involvement of actin and microtubules in regulation of bioluminescence and translocation of chloroplasts in the dinoflagellate *Pyrocystis lunula*. Botanica Marina 52:170-177
- Hendrie MS, Hodgkiss W, Shewan JM (1970) The identification, taxonomy and classification of luminous bacteria J Gen Microbiol 64:151-169
- Herman EM, Sweeney BM (1975) Circadian rhythm of chloroplast ultrastructure in *Gonyaulax polyedra*, concentric organization around a central cluster of ribosomes. J Ultrastruct Res 50:347-354
- Herren CM, Alldredge AL, Case JF (2004) Coastal bioluminescent marine snow: fine structure of bioluminescence distribution. Continental Shelf Research 24:413-429
- Herring P (1987) Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. J Biolum Chemilum 1:147-163

- Herring PJ (1978) Bioluminescence of invertebrates other than insects. In: Bioluminescence in action Academic Press Inc, London P J Herring (ed), pp 199-240
- Herring PJ, Clarke JR, Boletsky SV, Ryan KP (1981) The light organs of *Sepiolo atlantica* and *Spirula spirula* (Mollusca: Cephalopoda): bacterial and intrinsic systems in the order Sepioidea. J Mar Biol Ass UK 61:901-916
- Hisada M (1957) Membrane resting and action potentials from a protozoan, *Noctiluca scintillans*. J Cell Physiol 50:57-71
- Jeong HJ, Yoo YD, Kim JS, Seong KA, Kang NS, Kim TH (2010) Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. Ocean Sci J 45 (2):65-91
- Jester R, Lefebvre K, Langlois G, Vigilant V, Baugh K, Silver M (2009) A shift in the dominant toxin-producing algal species in central California alters phycotoxins in food webs. Harmful Algae 8:291-298
- Johnson BT (2005) Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations - Microtox® Acute Toxicity Test. C Blaise, J-F Férard (eds), Springer, Netherlands, 69-115
- Johnson CH, Hastings JW (1986) The elusive mechanisms of the circadian clock. Atn Scient 7:29-36
- Johnson CH, Inoui S, Flint A, Hastings JW (1985) Compartmentalization of algal bioluminescence: autofluorescence of bioluminescent particles in the dinoflagellate *Gonyaulax* as studied with image-intensified video microscopy and flow cytometry. The Journal of Cell Biology 100:1435-1446
- Johnson CH, Roeber J, Hastings JW (1984) Circadian changes in enzyme concentration account for rhythm of enzyme activity in *Gonyaulax*. Science 223:1428-1430
- Kaeding AJ, Ast JC, Pearce MM, Urbanczyk H, Kimura S, Endo H, Nakamura M, Dunlap PV (2007) Phylogenetic diversity and cosymbiosis in the bioluminescent symbioses of "*Photobacterium mandapamensis*". Appl Environ Microbiol 73 (10):3173-3182
- Kaplan H, Greenberg E (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. J Bacteriol 163:1210-1214
- Karp-Boss L, Boss E, Jumars PA (2000) Motion of dinoflagellates in simple shear flow. Limnology and Oceanography 45:1594-1602
- Kelly M, Katona S (1966) An endogenous diurnal rhythm of bioluminescence in a natural population of dinoflagellates. Biol Bull 131:115-126
- Keynan A, Hastings JW (1961) The isolation and characterization of dark mutants of luminescent bacteria. Biol Bull 121:375

- Kim G, Lee Y-W, Joung D-J, Kim K-R, Kim K (2006) Real-time monitoring of nutrient concentrations and red-tide outbreaks in the southern sea of Korea. *Geophys Res Lett* 33:L13607
- Knaust R, Urbig T, Li L, Taylor W, Woodland Hastings J (1998) The circadian rhythm of bioluminescence in *Pyrocystis* is not due to differences in the amount of luciferase: a comparative study of three bioluminescent marine dinoflagellates. *J Phycol* 34:167-172
- Krasnow R, Dunlap JC, Taylor W, Hastings JW, Vetterling W, Gooch VD (1980) Circadian spontaneous bioluminescent glow and flashing of *Gonyaulax polyedra*. *J Comp Physiol B* 138:19-26
- Kremp A, Lindholm T, Dresler N, Erler K, Gerdt G, Eirtovaara S, Leskinen E (2009) Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow waters of the Åland archipelago northern Baltic sea. *Harmful Algae* 8:318-328
- Krieger N, Hastings J (1968) Bioluminescence: pH activity profiles of related luciferase fractions. *Science* 161:586-589
- Kuo A, Blough NV, Dunlap PV (1994) Multiple N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers of luminescence in the marine symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* 176:7558-7565
- Kuo A, Callahan SM, Dunlap PV (1996) Modulation of luminescence operon expression by N-octanoyl-L-homoserine lactone in ainS mutants of *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* 178:971-976
- Lapota D, Galt C, Losee JR, Huddell HD, Orzech JK, Nealson KH (1988) Observations and measurements of planktonic bioluminescence in and around a milky sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 119:55-81
- Lapota D, Losee JR (1984) Observations of bioluminescence in marine plankton from the Sea of Cortez. *J Exp Mar Biol Ecol* 77:209-240
- Lapota D, Paden S, Duckworth D, Rosenberger DE, Case JF (1994) Coastal and oceanic bioluminescence trends in the southern California bight using MOORDEX bathyphotometers. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence* John Wiley & Sons, Chichester, England, Campbell, Kricka, Stanley (eds), pp 127-130
- Lapota D, Robayo Osorio A, Liao C, Bjorndal B (2007) The Use of Bioluminescent Dinoflagellates as an Environmental Risk Assessment Tool. *Marine Pollution Bulletin* 54:1857-1867
- Latz MI, Jeong HJ (1993) Effect of dinoflagellate diet and starvation on the bioluminescence of the heterotrophic dinoflagellate, *Protoperdinium divergens*. In: *Abstracts of the ONR Bioluminescence Symposium*, November, Maui, 1993:61
- Latz MI, Lee AO (1995) Spontaneous and stimulated bioluminescence of the dinoflagellate *Ceratocorys horrida* (Peridinales). *J Phycol* 31:120-132

- Latz MI, Rohr J (1999) Luminescent response of the red tide dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* to laminar and turbulent flow. *Limnol Oceanogr* 44:1423-1435
- Latz MI, Rohr J (2005) Glowing with the flow: ecology and applications of flow-stimulated bioluminescence. *Optics & Photonics News* 16 (10):40-45
- Lee CY, Szittner RB, Meighen EA (1991) The lux genes of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. *Eur J Biochem* 201:161-167
- Lee J (1972) Bacterial bioluminescence. Quantum yields and stoichiometry of the reactants reduced flavin mononucleotide, dodecanal and oxygen, and a product hydrogen peroxide. *Biochemistry* 11:3350-3359
- Lee K-H, Ruby EG (1992) Detection of the Light Organ Symbiont, *Vibrio fischeri*, in Hawaiian Seawater by Using Lux Gene Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (3):942-947
- Lee K-H, Ruby EG (1994) Effect of the squid host on the abundance and distribution of symbiotic *Vibrio fischeri* in nature. *Appl Environ Microbiol* 60:1565-1571
- Lee RE (2008) *Phycology*. 4th Edition, Cambridge University Press, 561pp
- Lewis J, Hallett R (1997) *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*) a blooming dinoflagellate. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 35:97-161
- Liu L, Hastings JW (2007) Two different domains of the luciferase gene in the heterotrophic dinoflagellate *Noctiluca scintillans* occur as two separate genes in photosynthetic species. *PNAS* 104 (3):696-701
- Liu X-J, Wong CK (2006) Seasonal and spatial dynamics of *Noctiluca scintillans* in a semi-enclosed bay in the northeastern part of Hong Kong. *Botanica Marina* 49:145-150
- Lovejoy C, Legendre L, Price NM (2002) Prolonged diatom blooms and microbial food web dynamics: experimental results from an Arctic polynya. *Aquatic Microbial Ecology* 29:267-278
- Lupp C, Urbanowski M, Greenberg EP, Ruby EG (2003) The *Vibrio fischeri* quorum-sensing systems ain and lux sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. *Mol Microbiol* 50:319-331
- Machabee S, Wall L, Morse D (1994) Expression and Genomic Organization of a Dinoflagellate Gene Family. *Plant Molecular Biology* 25:23-31
- Makemson J, Fulayfil N, Landry W, Vanert L, Wimpee C, Widder E, Case J (1997) *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Bacteriol* 47:1034-1039
- Maldonado EM, Latz M (2007) Shear-stress dependence of dinoflagellate bioluminescence. *Biol Bull* 212:242-249

- Manefield M, Turner S (2002) Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiology* 148:3762-3764
- Marasović I (1989) Encystment and excystment of *Gonyaulax polyedra* during a red tide. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 28 (1):35-41
- Marcinko CLJ, Painter SC, Martin AP, Allen JT (2013) A review of the measurement and modelling of dinoflagellate bioluminescence. *Progress in Oceanography* 109:117-129
- McFall-Ngai MJ (1999) Consequences of evolving with bacterial symbionts: insights from the squid-*Vibrio* associations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:235-256
- McFall-Ngai MJ, Ruby EG (1991) Symbiont recognition and subsequent morphogenesis as early events in an animal-bacterial mutualism. *Science* 254:1491-1494
- McMurry L, Hastings JW (1972) Circadian rhythms: mechanism of luciferase activity changes in *Gonyaulax*. *Biol Bull Mar Biol Lab Woods Hole* 143:196-206
- Meighen E (1991) Molecular Biology of Bacterial Bioluminescence. *Microbiological Reviews* 55 (1):123-142
- Meighen E, Dunlap P (1993) Physiological, biochemical and genetic control of bacterial bioluminescence. *Adv Microbial Physiol* 34:1-67
- Mensing AF, Case JF (1992) Dinoflagellate luminescence increases susceptibility of zooplankton to teleost predation. *Mar Biol* 112:207-210
- Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165-199
- Miller SD, Haddock SHD, Elvidge CD, Lee TF (2005) Detection of a bioluminescent milky sea from space. *PNAS* 102 (40):14181-14184
- Miyamoto CM, Lin YH, Meighen E (2000) Control of bioluminescence in *Vibrio fischeri* by the LuxO signal response regulator. *Mol Microbiol* 36:594-607
- Miyashiro T, Ruby EG (2012) Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* 84 (5):795-806
- Morales-Ramírez A, Viquez R, Rodríguez K, Vargas M (2001) Red tide bloom produced by *Lingulodinium polyedrum* (Peridinales, Dinophyceae) in Bahía Culebra, Papagayo Gulf, Costa Rica. *Rev Biol Trop* 49:19-23
- Morin JG (1983) Coastal bioluminescence: patterns and functions. *Bull Mar Sci* 33:787-817
- Morse D, Milos PM, Roux E, Hastings JW (1989) Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyaulax* involves translational control. *PNAS* 86:172-176
- Nawala T, Sibaoka T (1979) Coupling between action potential and bioluminescence in *Noctiluca*: effects of inorganic ions and pH in vacuolar sap. *J Comp Physiol* 134:137-149

- Nealson KH, Hastings JW (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*:496-518
- Nealson KH, Hastings JW (1991) The luminous bacteria. In: The prokaryotes 2nd edition, vol 1 Balows, Trueper, Dworkin, Harder & Schleifer (eds) Springer-Verlag, New York, pp 625-639
- Nealson KH, Hastings JW (2006) Quorum sensing on a global scale: massive numbers of bioluminescent bacteria make milky seas. *Appl Environ Microbiol*:2295-2297
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104:313-322
- Neiditch MB, Federle MJ, Pompeani AJ, Kelly RC, Swem DL, Jeffrey PD, Bassler BL, Hughson FM (2006) Ligand-Induced Asymmetry in Histidine Sensor Kinase Complex Regulates Quorum Sensing. *Cell* 126:1095-1108
- Ng W-L, Bassler BL (2009) Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics* 43:197-222
- Nicolas M-T, Morse D, Bassot J-M, Hastings JW (1991) Colocalization of luciferin binding protein and luciferase to the scintillons of *Gonyaulax polyedra* revealed by double immunolabeling after fast-freeze fixation *Protoplasma* 160:159-166
- Nicolas M-T, Nicolas G, Johnson CH, Bassot J-M, Hastings JW (1987a) Characterization of the bioluminescent organelles in *Gonyaulax polyedra* (Dinoflagellates) after fast-freeze fixation and antiluciferase immunogold staining. *The Journal of Cell Biology* 105:723-735
- Nicolas M-T, Sweeney BM, Hastings JW (1987b) The ultrastructural localization of luciferase in three bioluminescent dinoflagellates, two species of *Pyrocystis*, and *Noctiluca*, using antiluciferase and immunogold labelling. *Journal of Cell Science* 87:189-196
- O'Grady EA, Wimpee CF (2008) Mutations in the lux operon of natural dark mutants in the genus *Vibrio*. *Appl Environ Microbiol*:61-66
- Omori M, Hamner WM (1982) Patchy distribution of zooplankton: Behavior, population assessment and sampling problems. *Mar Biol* 72:193-200
- Ondercin DG, Atkinson CA, Kiefer DA (1995) The distribution of bioluminescence and chlorophyll during the late summer in the North Atlantic: Maps and a predictive model. *Journal of Geophysical Research* 100:6575-6590
- Orzech J, Nealson K (1984) Bioluminescence of marine snow: its effect on the optical properties of the sea. *Proc Internat Soc Optical Eng* 489:100-106

- Painting SJ, Lucas MI, Peterson WT, Brown C, Hutchings L, Mitchell-Innes BA (1993) Dynamics of bacterioplankton, phytoplankton and mesozooplankton communities during the development of an upwelling plume in the southern Benguela. *Mar Ecol Prog Ser* 100:35-53
- Porter KG, Porter JW (1979) Bioluminescence in marine plankton: a coevolved antipredation system. *Am Nat* 114:458-461
- Poupin J, Cussatlegras A-S, Geistdoerfer P (1999) Plancton marin bioluminescent. Inventaire documenté des espèces et bilan des formes les plus communes de la mer d'Iroise. Rapport Scientifique du LOEN
- Ramalho CB, Hastings JW, Colepicolo P (1995) Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in cellular protein levels. *Plant Physiol* 107:225-231
- Reichelt JL, Baumann P (1973) Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch Mikrobiol* 94:283-330
- Reichelt JL, Nealson K, Hastings JW (1977) The specificity of symbiosis: pony fish and luminescent bacteria. *Arch Microbiol* 112:157-161
- Roenneberg T, Mittag M (1996) The circadian program of algae. *Semin Cell Dev Biol* 7:753-763
- Rohr J, Hyman M, Fallon S, Latz MI (2002) Bioluminescence flow visualization in the ocean: an initial strategy based on laboratory experiments. *Deep-Sea Res* 49:2009-2033
- Rohr J, Latz MI, Fallon S, Nauen JC, Hendricks E (1998) Experimental approaches towards interpreting dolphin-stimulated bioluminescence. *J Exp Biol* 201:1447-1460
- Ruby EG, Asato LM (1993) Growth and flagellation of *Vibrio fischeri* during initiation of the sepiolid squid light organ symbiosis. *Arch Microbiol* 159:160-167
- Ruby EG, Lee KH (1998) The *Vibrio fischeri* - *Euprymna scolopes* light organ association: current ecological paradigms. *Appl Environ Microbiol* 64:805-812
- Ruby EG, McFall-Ngai MJ (1992) A squid that glows in the night: development of an animal-bacterial mutualism. *J Bacteriol* 174:4865-4870
- Ruby EG, Urbanowski M, Campbell J, Dunn A, Faini M, Gunsalus R, Lostroh P, Lupp C, McCann J, Millikan D, Schaefer A, Stabb E, Stevens A, Visick K, Whistler C, Greenberg EP (2005) Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *PNAS* 102:3004-3009
- Schaefer AL, Greenberg EP, Oliver CM, Oda Y, Huang JJ, Bittan-Banin G, Peres CM, Schmidt S, Juhaszova K, Sufrin JR, Harwood CS (2008) A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* 454:595-599

- Schaefer AL, Hanzelka BL, Eberhard A, Greenberg EP (1996) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J Bacteriol* 178:2897-2901
- Schmitter RE, Njus D, Sulzman FM, Gooch DV, Hastings JW (1976) Dinoflagellate bioluminescence: a comparative study of in vitro components. *J Cell Physiol* 87:123-134
- Schuster M, Greenberg EP (2008) LuxR-type proteins in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing: distinct mechanisms with global implications. In: *Chemical Communication Among Bacteria*, SC Winans, BL Bassler, Washington, DC (eds): ASM Press, pp 133-144
- Seliger HH, Fastie WG, Taylor WR, McElroy WD (1961) Bioluminescence in Chesapeake Bay. *Science* 133:699-700
- Seo KS, Fritz L (2000) Cell ultrastructural changes correlate with circadian rhythms in *Pyrocystis lunula* (Pyrrophyta). *J Phycol* 36:351–358
- Shulman I, Penta B, Moline MA, Haddock SHD, Anderson S, Oliver MJ, Sakalaukus P (2012) Can vertical migrations of dinoflagellates explain observed bioluminescence patterns during an upwelling event in Monterey Bay, California? *J Geophys Res-Oceans* 117
- Slonczewski J, Foster JW (2009) *Microbiology an Evolving Science*. New York: WW Norton and Company, Inc, 1st ed
- Smayda TJ (2010) Adaptations and selection of harmful and other dinoflagellates species, in upwelling systems. 2. Monlity and migratory behavior. *Prog Oceanogr* 85:71-91
- Soly R, Mancini J, Ferri S, Boylan M, Meighen E (1988) A new lux gene in bioluminescent bacteria codes for a protein homologous to the bacterial luciferase subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 155:351-358
- Sriwoon R, Pholpunthin P, Lirdwitayaprasit T, Kishino M, Furuya K (2008) Population dynamics of green *Noctiluca scintillans* (Dinophyceae) associated with the monsoon cycle in the upper Gulf of Thailand. *Journal of Phycology* 44:605-615
- Staples RF (1966) The distribution and characteristics of surface bioluminescence in the oceans. Naval Oceanographic Office Technical Report TR-184:1-48
- Stevens A, Dolan K, Greenberg E (1994) Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *PNAS* 91:12619-12623
- Stokes MD, Grant GB, Latz MI, Rohr J (2004) Bioluminescence imaging of wave-induced turbulence. *J Geophys Res* 109 (C01004):1-8

- Sullivan JM, Swift E (1995) Photoenhancement of bioluminescence capacity in natural and laboratory populations of the autotrophic dinoflagellate *Ceratium fusus* (Ehrenb.) Dujardin. *Journal of Geophysical Research* 100 (4):6565-6574
- Sulzman FN, Krieger NR, Gooch VD, Hastings JW (1978) A circadian rhythm of the luciferin binding protein from *Gonyaulax polyedra*. *J Comp Physiol* 128:251-257
- Surette MG, Miller MB, Bassler BL (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *PNAS* 96:1639-1644
- Swartzman E, Silverman M, Meighen E (1992) The luxR gene product of *Vibrio harveyi* is a transcriptional activator of the lux promoter. *J Bacteriol* 174:7490-7493
- Sweeney B (1971) Laboratory studies of a green *Noctiluca* from New Guinea. *J Phycol* 7:53-58
- Sweeney BM (1979) Bioluminescence and circadian rhythms. In: Taylor, F J R (ed) *The Biology of Dinoflagellates Botanical Monographs*, vol 21 Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp 269-281
- Sweeney BM (1981a) The circadian rhythm in bioluminescence, photosynthesis and organellar movements in the large dinoflagellate, *Pyrocystis fusiformis*. In: Schweiger, H G (ed) *International Cell Biology Springer-Verlag*, Berlin, pp 807-814
- Sweeney BM (1981b) Variations in the bioluminescence per cell in dinoflagellates. In: Neilson, K H (ed), *Bioluminescence Current Perspectives Burgess Publishing*, Minneapolis, pp 90-94
- Sweeney BM (1987) *Rhythmic phenomena in plants*. 2nd edn Academic Press, NY
- Sweeney BM, Hastings JW (1957) Characteristics of the diurnal rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *J Cell Comp Physiol* 49:115-128
- Sweeney BM, Haxo FT, Hastings JW (1959) Action spectra for two effects of light on luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *J Gen Physiol* 43:285-299
- Swift E, Biggley WH, Seliger HH (1973) Species of oceanic dinoflagellates in the genera *Dissodinium* and *Pyrocystis*: interclonal and interspecific comparisons of the color and photon yield of bioluminescence. *J Phycol* 9:420-426
- Swift E, Biggley WH, Verity PG, Brown DT (1983) Zooplankton are major sources of epipelagic bioluminescence in the southern Sargasso Sea. *Bull Mar Sci* 33:855-863
- Swift E, Meunier VA (1976) Effects of light intensity on division rate, stimutable bioluminescence, and cell size of the oceanic dinoflagellate *Dissodinium lunula*, *Pyrocystis fusiformis* and *P. noctiluca*. *J Phycol* 12:14-20
- Swift E, Taylor WR (1967) Bioluminescence and plastid movement in the dinoflagellate *Pyrocystis lunula*. *J Phycol* 3:77-81

- Taga M, Bassler B (2003) Chemical communication among bacteria. PNAS 100 (2):14549-14554
- Tett PB (1969) Study of marine bioluminescence. Final report on agreement No. AT/992/03/RL. Scottish Marine Biological Association, Dunstaffnage Marine Research Laboratory:71
- Tett PB (1971) The relation between dinoflagellates and the bioluminescence of sea water. J Mar Biol Ass UK 51:183-206
- Tett PB, Kelly MG (1973) Marine bioluminescence. Oceanogr Mar Biol Annu Rev 11:89-173
- Thomas WH, Gibson CH (1990) Effects of small-scale turbulence on microalgae. J Appl Phycol 2:71-77
- Tiselius P, Kiorboe T (1998) Colonization of diatom aggregates by the dinoflagellate *Noctiluca scintillans*. Limnology and Oceanography 43 (1):154-159
- Tu KC, Bassler BL (2006) Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. Genes and Development 21:221-233
- Turner RJ (1965) Notes on the nature and occurrence of marine bioluminescent phenomena. Internal Report No. B4. July. National Institute of Oceanography Wormley, Godalming, Surrey, 30pp
- Uhlig G, Sahlig G (1990) Long-term studies on *Noctiluca scintillans* in the German Bight. Population dynamics and red tide phenomena 1968-1988. Netherland Journal of Sea Research 15:101-112
- Urbanczyk H, Ast J, Higgins M, Carson J, Dunlap P (2007) Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 57:2823-2829
- Utyushev RN, Levin LA, Gitelson JJ (1999) Diurnal rhythm of the bioluminescent field in the ocean epipelagic zone. Mar Biol 134:439-448
- Valiadi M, Iglesias-Rodriguez MD (2014) Diversity of the luciferin binding protein gene in bioluminescent dinoflagellates - Insights from a new gene in *Noctiluca scintillans* and sequences from Gonyaulacoid genera. Journal of Eukaryotic Microbiology 61:134-145
- Valiadi M, Iglesias-Rodriguez MD, Amorim A (2012) Distribution and Genetic Diversity of the Luciferase Gene Within Marine Dinoflagellates. Journal of Phycology 48:826-836
- Valiadi M, Painter SC, Allen JT, Balch WM, Iglesias-Rodriguez MD (2014) Molecular Detection of Bioluminescent Dinoflagellates in Surface Waters of the Patagonian Shelf During Early Austral Summer 2008. PLoS ONE 9 (6):e98849

- van Rhijn P, Vanderleyden J (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol Rev 59:124-142
- van Rijssel M, de Boer MK, Tyl MR, Gieskes WWC (2008) Evidence for inhibition of bacterial luminescence by allelochemicals from *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae), and the role of light and microalgal growth rate. Hydrobiologia 596:289-299
- Verma SC, Miyashiro T (2013) Quorum sensing in the squid-vibrio symbiosis. Int J Mol Sci 14:16386-16401
- Vilicic D, Marasovic I, Miokovic D (2002) Checklist of phytoplankton in the eastern Adriatic Sea. Acta Botanica Croatia 61 (1):57-91
- Villareal TA, Pilskaln CH, Montoya JP, Dennett M (2014) Upward nitrate transport by phytoplankton in oceanic waters: balancing nutrient budgets in oligotrophic seas. PeerJ 2:e302
- Wada M, Azuma N, Mizuno N, Kurokura H (1999) Transfer of symbiotic luminous bacteria from parental *Leiognathus nuchalis* to offspring. Mar Biol 135:683-687
- Waters C, Bassler B (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol 21:319-346
- Wei SL, Young RE (1989) Development of symbiotic bacterial bioluminescence in a nearshore cephalopod, *Euprymna scolopes*. Mar Biol 103:541-546
- White HH (1979) Effects of dinoflagellate bioluminescence on the ingestion rates of herbivorous zooplankton. J Exp Mar Biol Ecol 36:217-224
- Widder EA, Case JF (1982) Luminescent microsource activity in bioluminescence of the dinoflagellate, *Pyrocystis fusiformis*. J Comp Physiol 145:517-527
- Wier AM, Nyholm SV, Mandel MJ, Massengo-Tiassé RP, Schaefer AL, Koroleva I, Splinter-BonDurant S, Brown B, Manzella L, Snir E, Almabrazi H, Scheetz TE, de Fatima Bonaldo M, Casavant TL, Soares MB, Cronan JE, Reed JL, Ruby EG, McFall-Ngai MJ (2010) Transcriptional patterns in both host and bacterium underlie a daily rhythm of anatomical and metabolic change in a beneficial symbiosis. PNAS 107 (5):2259–2264
- Wilson T, Hastings J (1998) Bioluminescence. Annu Rev Cell Dev Biol 14:197-230
- Wilson T, Hastings J (2013) Bioluminescence: living lights, lights for living. Harvard University Press Cambridge, MA, 176 pp
- Wimpee CF, Nadeau T-L, Neilson KH (1991) Development of Species-Specific Hybridization Probes for Marine Luminous Bacteria by Using *in vitro* DNA Amplification. Applied and Environmental Microbiology 57 (5):1319-1324

- Withers H, Swift S, Williams P (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:186-193
- Yentsch CS, Laird JC (1968) Seasonal sequence of bioluminescence and the occurrence of endogenous rhythms in oceanic waters off Woods Hole, Massachusetts. *J Mar Res* 26:127-133
- Zarubin M, Shimshon B, Ionescu M, Genin A (2012) Bacterial bioluminescence as a lure for marine zooplankton and fish. *PNAS* 109 (3):853-857

Tableaux annexes

Tableau 12 : Diversité taxonomique des souches bactériennes possédant au moins un gène de la famille *luxI* dans leur génome et répertorié dans la base de données NCBI

gène	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
<i>luxI</i> -like	<i>Alpha-Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Roseobacter</i>	<i>denitrificans</i>
				<i>Phaeobacter</i>	<i>gallaeciensi</i>
				<i>Octadecabacter</i>	<i>arcticus</i>
					<i>antarticus</i>
				<i>Celeribacter</i>	<i>baekdonensis</i>
				<i>Citreicella</i>	<i>sp</i>
				<i>Ruegeria</i>	<i>pomeroyi</i>
					<i>lacuscaerulensis</i>
				<i>Sagittula</i>	<i>stellata</i>
				<i>Salipiger</i>	<i>mucosus</i>
				<i>Roseovarius</i>	<i>mucosus</i>
				<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
				<i>Sulfitobacter</i>	<i>sp</i>
				<i>Roseivivax</i>	<i>halodurans</i>
				<i>Rhodobacter</i>	<i>sphaeroides</i>
				<i>Oceanicola</i>	<i>granulosus</i>
				<i>Dinoroseobacter</i>	<i>shibae</i>
				<i>Rubellimicrobium</i>	<i>mesophilum</i>
				<i>Silicibacter</i>	<i>sp</i>
				<i>Salipiger</i>	<i>mucosus</i>
			<i>Hyphomonadaceae</i>	<i>Hirschia</i>	<i>baltica</i>
		<i>Rhizobiales</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>palustris</i>
				<i>Bradyrhizobium</i>	<i>oligotrophicum</i>
					<i>japonicum</i>
					<i>elkanii</i>

<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>hamburgensis</i>
		<i>winogradskyi</i>
	<i>Oligotropha</i>	<i>carboxidovorans</i>
		<i>winogradskyi</i>
	<i>Agrobacterium</i>	<i>albertimagni</i>
		<i>vitis</i>
		<i>tumefaciens</i>
		<i>rhizogenes</i>
		<i>fabrum</i>
		<i>radiobacter</i>
<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti</i>
		<i>fredii</i>
		<i>medicae</i>
	<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i>
		<i>leguminosarum</i>
		<i>tropici</i>
		<i>mesoamericanum</i>
		<i>giardinii</i>
		<i>grahamii</i>
	<i>Ensifer</i>	<i>adhaerens</i>
<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Nitratioreductor</i>	<i>aquibiodomus</i>
	<i>Chelativorans</i>	<i>sp</i>
	<i>Hoeflea</i>	<i>phototrophica</i>
	<i>Mesorhizobium</i>	<i>alhagi</i>
		<i>loti</i>
		<i>australicum</i>
		<i>ciceri</i>
		<i>metallidurans</i>
	<i>Methylobacterium</i>	<i>extorquens</i>
		<i>populi</i>
		<i>nodulans</i>

			<i>radiotolerans</i>
	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Beijinrinckia</i>	<i>indica</i>
		<i>Methylocella</i>	<i>silvestris</i>
		<i>Chelatococcus</i>	<i>sp</i>
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>denitrificans</i>
			<i>zavarzinii</i>
			<i>vannielli</i>
	<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>intermedium</i>
	<i>Rhodobiaceae</i>	<i>Amorphus</i>	<i>coralli</i>
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>tianshanense</i>
<i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Thalassospira</i>	<i>profundimaris</i>
		<i>Magnetospirillum</i>	<i>magnetotacticum</i>
			<i>gryphiswaldense</i>
		<i>Rhodospirillum</i>	<i>rubrum</i>
		<i>Caenispirillum</i>	<i>salinarum</i>
		<i>Azospirillum</i>	<i>amazonense</i>
		<i>Tistrella</i>	<i>mobilis</i>
	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>tropicalis</i>
		<i>Gluconacetobacter</i>	<i>diazotrophicus</i>
<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Phenylobacterium</i>	<i>zucineum</i>
		<i>Caulobacter</i>	<i>vibrioides</i>
<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingopyxis</i>	<i>alaskensis</i>
		<i>Novosphingobium</i>	<i>sp</i>
		<i>Sphingomonas</i>	<i>sp</i>
		<i>Citromicorbium</i>	<i>bathyomarinum</i>
		<i>Sphingobium</i>	<i>japonicum</i>
<i>Kiloniellales</i>	<i>Kiloniellaceae</i>	<i>Kiloniella</i>	<i>laminariae</i>
<i>Kordiimonadales</i>	<i>Kordiimonadaceae</i>	<i>Kordiimonas</i>	<i>gwangyangensis</i>
<i>Rickettsiales</i>	<i>Rickettsiales incertae sedis</i>	<i>Candidatus</i>	<i>odyssella</i>
<i>Beta-Proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia mallei</i>

			<i>cepacia</i>
			<i>cenocepacia</i>
			<i>multivorans</i>
			<i>stabilis</i>
			<i>ambifaria</i>
			<i>pyrrocinia</i>
			<i>ubonensis</i>
			<i>oklahomoensis</i>
			<i>phytofirmans</i>
			<i>ubonensis</i>
			<i>unamae</i>
			<i>kururiensis</i>
			<i>glumae</i>
			<i>gladioli</i>
			<i>pseudomallei</i>
			<i>vietnamensis</i>
			<i>kirkii</i>
			<i>thailandensis</i>
		<i>Ralstonia</i>	<i>solanacearum</i>
			<i>syzigii</i>
		<i>Cupriavidus</i>	<i>necator</i>
	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Collimonas</i>	<i>fungivorans</i>
	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>radicis</i>
		<i>Verminephrobacter</i>	<i>aporrertodeae</i>
		<i>Delftia</i>	<i>sp</i>
		<i>Thiomonas</i>	
		<i>Acidovorax</i>	<i>citrulli</i>
<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>Nitrosospira</i>	<i>sp</i>
<i>Rhodocyclales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Thauera</i>	<i>phenylacetica</i>
<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Chitiniphilus</i>	<i>shinanonensis</i>
		<i>Chromobacterium</i>	<i>violaceum</i>

<i>Gamma-Proteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Aliivibrio</i>	<i>fischeri</i>
				<i>logei</i>
				<i>salmonicida</i>
			<i>Vibrio</i>	<i>fischeri</i>
				<i>mimicus</i>
				<i>parahaemolyticus</i>
				<i>shilonii</i>
				<i>furnisii</i>
				<i>ordalii</i>
				<i>fluvialis</i>
				<i>anguillarum</i>
				<i>cholerae</i>
			<i>Photobacterium</i>	<i>phosphoreum</i>
				<i>leiognathi</i>
	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumanii</i>
				<i>pittii</i>
				<i>calcoaceticus</i>
				<i>nosocomialis</i>
				<i>oleivorans</i>
		<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>
				<i>fluorescens</i>
				<i>putida</i>
				<i>chlororaphis</i>
				<i>amygdali</i>
				<i>syringae</i>
				<i>fuscovaginae</i>
				<i>hydrophila</i>
	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>aquariorum</i>
				<i>diversa</i>
				<i>media</i>

			<i>veronii</i>
			<i>caviae</i>
			<i>sobria</i>
			<i>molluscorum</i>
			<i>bestiarum</i>
			<i>enteropelogenes</i>
			<i>salmonicida</i>
			<i>bestiarum</i>
			<i>popoffii</i>
<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>rodentium</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>sp</i>
		<i>Pectobacterium</i>	<i>carotovorum</i>
			<i>atrosepticum</i>
		<i>Brenneria</i>	<i>rubrifaciens</i>
		<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>
		<i>Sodalis</i>	<i>glossinidius</i>
		<i>Pantoea</i>	<i>anantis</i>
			<i>vagans</i>
			<i>stewartii</i>
			<i>agglomerans</i>
		<i>Erwinia</i>	<i>billingiae</i>
			<i>pyrifoliae</i>
			<i>tasmaniensis</i>
			<i>tracheiphilla</i>
			<i>amylovora</i>
			<i>chrysanthemi</i>
		<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>
			<i>ictaluri</i>
		<i>Serratia</i>	<i>plymuthica</i>
			<i>proteamaculans</i>
			<i>liquefaciens</i>

			<i>marescens</i>
			<i>proteamaculans</i>
			<i>odorifera</i>
			<i>chrysantemi</i>
			<i>toletana</i>
		<i>Dickeya</i>	<i>dadantii</i>
		<i>Pectobacterium</i>	<i>carotovorum</i>
			<i>betavascularum</i>
			<i>atrosepticum</i>
			<i>wasabiae</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>lignolyticus</i>
		<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>
			<i>aldovae</i>
			<i>massiliensis</i>
			<i>pestis</i>
			<i>pseudotuberculosis</i>
			<i>ruckeri</i>
		<i>arsenophonus</i> <i>endosymbiont</i>	<i>nasoniae</i>
		<i>candidatus</i>	<i>regiella</i>
			<i>hamiltonella</i>
<i>Xanthomonadales</i>	<i>Sinobacteraceae</i>	<i>Hydrocarboniphaga</i>	<i>effusa</i>
	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Rhodanobacter</i>	<i>sp</i>
<i>Chromatiales</i>	<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	<i>Arhodomonas</i>	<i>aquaeolei</i>
	<i>Halothiobacillaceae</i>	<i>Halothiobacillus</i>	<i>neapolitanus</i>
<i>Methylococcales</i>	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylobacter</i>	<i>tundripalum</i>
<i>Acidithiobacillales</i>	<i>Acidithiobacillaceae</i>	<i>Acidithiobacillus</i>	<i>ferrooxidans</i>
<i>Alteromonadales</i>	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanella</i>	<i>handei</i>
			<i>woodyi</i>
	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>citrea</i>
	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Agarivorans</i>	<i>albus</i>

		<i>Moritellaceae</i>	<i>Moritella</i>	<i>sp</i>
		<i>unclassified Gamma Proteobacteria</i>	<i>Reinekea</i>	<i>blandensis</i>
<i>Delta-Proteobacteria</i>	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>magneticus</i>
	<i>Desulforomonadales</i>	<i>Geobacteraceae</i>	<i>Geobacter</i>	<i>uraniireucens</i>
				<i>daltoni</i>
	<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfocapsa</i>	<i>sulfexigens</i>

Tableau 13 : Diversité taxonomique des souches bactériennes possédant un gène de la famille *ainS* dans leur génome et répertorié dans la base de données NCBI

gène	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
<i>ainS</i>	<i>Gamma-Proteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Aliivibrio</i>	<i>fischeri</i>
					<i>logei</i>
					<i>salmonicida</i>
				<i>Vibrio</i>	<i>fischeri</i>

<i>luxM</i>	<i>Gamma-Proteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>phosphoreum</i>
					<i>profundum</i>
					<i>angustum</i>
				<i>Alliivibrio</i>	<i>fischeri</i>
					<i>salmonicida</i>
				<i>Grimontia</i>	<i>hollisae</i>
				<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i>
					<i>splendidus</i>
					<i>harveyi</i>
					<i>alginolyticus</i>
					<i>corallilyticus</i>
					<i>metschnikovii</i>
					<i>anguillarum</i>
					<i>ordalii</i>
					<i>cyclotrophicus</i>

	<i>parahaemolyticus</i>
	<i>rotiferianus</i>
	<i>sinaloensis</i>
	<i>fischeri</i>
	<i>brasiliensis</i>
	<i>tubiashii</i>
	<i>caribbenticus</i>

	<i>Gamma-Proteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
					<i>harveyi</i>
					<i>alginolyticus</i>
					<i>metschnikovii</i>
vanM					<i>anguillarum</i>
					<i>ordalii</i>
					<i>parahaemolyticus</i>
					<i>sinaloensis</i>
					<i>vibrionales bacterium</i>

Tableau 14 : Diversité taxonomique des souches bactériennes possédant un gène de la famille *hdtS* dans leur génome et répertorié dans la base de données NCBI

gène	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
<i>hdtS</i>	<i>Gamma-Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>
					<i>extremaustralis</i>
					<i>mandelii</i>
					<i>entomophila</i>
					<i>protegens</i>
					<i>syringae</i>
					<i>chlororaphis</i>
					<i>avellanae</i>
					<i>synxantha</i>

			<i>fuscovaginae</i>
			<i>fragi</i>
			<i>putida</i>
			<i>savastanoi</i>
			<i>viridiflava</i>
			<i>aeruginosa</i>
			<i>pseudoalcaligenes</i>
			<i>mendocina</i>
			<i>stutzeri</i>
			<i>psychrotolerans</i>
			<i>brassicacearum</i>
			<i>fulva</i>
			<i>denitrificans</i>
		<i>Cellvibrio</i>	<i>sp</i>
		<i>Azotobacter</i>	<i>vinelandii</i>
<i>Oceanospirillales</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Marinomonas</i>	<i>sp</i>
	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Halomonas</i>	<i>elogata</i>
	<i>Hahellaceae</i>	<i>Hahella</i>	<i>sp</i>
	<i>Alcanivoracaceae</i>	<i>Alcalinovorax</i>	<i>hongdengensis</i>
<i>Chromatiales</i>	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Allochromatium</i>	<i>vinosum</i>
		<i>Nitrosococcus</i>	<i>halophilus</i>
			<i>oceani</i>
		<i>Marichromatium</i>	<i>purpuratum</i>
		<i>Thiocapsa</i>	<i>marina</i>
		<i>Thiorhodococcus</i>	<i>drewsii</i>
	<i>Ectothiorhodopiraceae</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>mobilis</i>
<i>Thiotrichales</i>	<i>Piscirickettsiaceae</i>	<i>Methylophaga</i>	<i>aminisulfidivorans</i>
	<i>Francisellaceae</i>	<i>Francisella</i>	<i>tularensis</i>
<i>Cardiobacteriales</i>	<i>Cardiobacteriaceae</i>	<i>Cardiobacterium</i>	<i>hominis</i>
<i>Beta-Proteobacteria</i>	<i>Methylophilales</i>	<i>Methylophilaceae</i>	<i>flagellatus</i>
	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Kingella</i>
			<i>denitrificas</i>

			<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>
				<i>subflava</i>
	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Herbaspirillum</i>	<i>sp</i>
			<i>Herminiimonas</i>	<i>arsenicoxydans</i>
			<i>Janthinobacterium</i>	<i>sp</i>
		<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>oklahomensis</i>
				<i>pseudomallei</i>
				<i>rhizoxinica</i>
	<i>Gallionellales</i>	<i>Gallionellaceae</i>	<i>Gallionella</i>	<i>capsiferriformans</i>

<i>act</i>	<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Acidithiobacillales</i>	<i>Acidithiobacillaceae</i>	<i>Acidithiobacillus</i>	<i>ferrooxidans</i>
------------	-----------------------------	----------------------------	-----------------------------	--------------------------	---------------------

Tableau 15 : Diversité taxonomique des souches bactériennes possédant un gène de la famille *luxS* dans leur génome et répertorié dans la base de données NCBI

Gram	Embranchement	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
positive	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteridae</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>
						<i>adolescentis</i>
						<i>animlis</i>
						<i>dentium</i>
			<i>Actinomycetales</i>	<i>Corynebacterineae</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>
				<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>
				<i>Micrococcineae</i>	<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>
					<i>Microbacterium</i>	<i>testaceum</i>
		<i>Coriobacteridae</i>	<i>Coriobacteriales</i>	<i>Ccoriobacterineae</i>	<i>Collinsella</i>	<i>aerofaciens</i>
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>carnosus</i>
						<i>aureus</i>
				<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>
						<i>cereus</i>
						<i>thuringiensis</i>
					<i>Lysinibacillus</i>	<i>fusiformis</i>
				<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria</i>	<i>monocytogene</i>

				s
	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosum</i>
				<i>reuteri</i>
				<i>casei</i>
				<i>helveticus</i>
		<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>suis</i>
				<i>mutans</i>
				<i>agalactiae</i>
				<i>bovis</i>
				<i>salivarius</i>
				<i>pyogenes</i>
				<i>infantarius</i>
				<i>pneumoniae</i>
		<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>sp</i>
<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>scindens</i>
				<i>leptum</i>
				<i>acidurici</i>
				<i>spiroforme</i>
				<i>sporogenes</i>
				<i>bartlettii</i>
				<i>ramosum</i>
		<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Faecalibactrium</i>	<i>prausnitzii</i>
			<i>Ssubdoligranulum</i>	<i>variabile</i>
			<i>Ruminococcus</i>	<i>lactaris</i>
				<i>torques</i>
			<i>Anaerotruncus</i>	<i>colihominis</i>
		<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Anaerofustis</i>	<i>stercorihominis</i>
			<i>Eubacterium</i>	<i>ventriosum</i>
				<i>dolichum</i>
		<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Anaerostipes</i>	<i>caccae</i>
			<i>Coprococcus</i>	<i>eutactus</i>
			<i>Dorea</i>	<i>forminigenera</i>

						<i>ns</i>
negative	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>phosphoreum</i>
						<i>damselae</i>
						<i>profundum</i>
						<i>leiognathi</i>
						<i>angustum</i>
					<i>Vibrio</i>	<i>fischeri</i>
						<i>harveyi</i>
						<i>alginotolicus</i>
						<i>anguillarum</i>
						<i>parahaemolyticus</i>
						<i>vulnificus</i>
						<i>splendidus</i>
						<i>angustum</i>
						<i>mimicus</i>
						<i>shilonii</i>
						<i>ichthyoenteri</i>
						<i>scophthalmi</i>
						<i>metschnikovii</i>
						<i>ordalii</i>
						<i>nigripulchritudo</i>
						<i>corallilyticus</i>
						<i>furnissii</i>
						<i>sinaloensis</i>
						<i>cyclotrophicus</i>
						<i>tubiashoo</i>
						<i>orientalis</i>
						<i>brasiliensis</i>
						<i>campbellii</i>
						<i>rotiferianus</i>

			<i>cholerae</i>
		<i>Aliivibrio</i>	<i>salmonicida</i>
<i>Alteromonadales</i>	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanella</i>	<i>oneidensis</i>
			<i>violacea</i>
			<i>benthica</i>
			<i>halifaxensis</i>
			<i>piezotolerans</i>
			<i>pealeana</i>
			<i>loihica</i>
			<i>baltica</i>
			<i>woodyi</i>
			<i>sediminis</i>
			<i>amazoniensis</i>
	<i>Ferrimonadaceae</i>	<i>Ferimonas</i>	<i>balearica</i>
	<i>Moritellaceae</i>	<i>Moritella</i>	<i>sp</i>
<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Oceanimonas</i>	<i>sp</i>
		<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>
<i>Oceanospirillales</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Marinomonas</i>	<i>mediterranea</i>
<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea</i>	<i>ananatis</i>
		<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
		<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>
			<i>bongori</i>
		<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>
			<i>albertii</i>
			<i>hermanii</i>
		<i>Providencia</i>	<i>stuartii</i>
		<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>
			<i>penneri</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>mori</i>
			<i>radicincitans</i>
			<i>cancerogenus</i>

				<i>asburiae</i>
				<i>cloacae</i>
				<i>hormaechei</i>
			<i>Citrobacter</i>	<i>koseri</i>
				<i>rodentium</i>
			<i>Cronobacter</i>	<i>turicensis</i>
				<i>sakazakii</i>
			<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i>
			<i>Yersinia</i>	<i>frederiksenii</i>
				<i>mollaretti</i>
				<i>ruckeri</i>
				<i>kristensenii</i>
				<i>aldovae</i>
				<i>intermedia</i>
	<i>Pasteurellales</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Mannheimia</i>	<i>succiniciproducens</i>
			<i>Actinobacillus</i>	<i>minor</i>
			<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>
				<i>parasuis</i>
				<i>pittmaniae</i>
				<i>parainfluenzae</i>
				<i>haemolyticus</i>
			<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>
			<i>Aggregatibacter</i>	<i>actinomycetemcomitans</i>
				<i>segnis</i>
				<i>aphrophilus</i>
<i>Beta-Proteobacteria</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i>	<i>shayegannii</i>
				<i>macacae</i>
				<i>meningitidis</i>
				<i>polysaccharea</i>
				<i>cinerea</i>

					<i>mucosa</i>
					<i>lactamica</i>
					<i>gonorrhoeae</i>
					<i>subflava</i>
					<i>wadsworthii</i>
					<i>sicca</i>
					<i>flavescens</i>
	<i>Epsilon-Proteobacteria</i>	<i>Nautiliales</i>	<i>Nautiliaceae</i>	<i>Caminibacter</i>	<i>mediatlanticus</i>
		<i>Campylobacterales</i>	<i>Helicobacteraceae</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>
					<i>canadensis</i>
					<i>winghamensis</i>
			<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>
					<i>jejuni</i>
				<i>Arcobacter</i>	<i>butzleri</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>uniformis</i>
					<i>stercoris</i>
					<i>coprocola</i>
					<i>eggerthii</i>
					<i>dorei</i>
					<i>plebeius</i>
<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetia</i>	<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Borrelia</i>	<i>burgdorferi</i>
					<i>valaisiana</i>
					<i>garnii</i>
					<i>afzelii</i>
				<i>Treponema</i>	<i>primitia</i>

Tableau 16 : Exemples de voies du QS basées sur les familles de gènes *ainS*, *hdtS* et *luxI* et type d'AHLs produites

Les 3 familles de gènes *ainS*, *hdtS* et *luxI* codant des AHLs synthases sont représentées. Colonne 1 nom des gènes constituant chacune des 3 familles, colonne 2 AHL potentiellement produite par l' AHL synthase codée par le gène, colonne 3 identification taxonomique colonne 4 phénotype régulé et colonne 5 référence bibliographique associée à ces données.

Gène	Formule AHL	Bactérie (genre/espèce)	Phénotype(s) régulé(s)	Références
Famille <i>ainS</i>				
<i>ainS</i>	C8-HSL	<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminescence	(Gilson et al. 1995)
<i>luxM</i>	3-OH-C4-HSL	<i>Vibrio harveyi</i>	Bioluminescence	(Milton et al. 2001)
<i>vanM</i>	3-OH-C6-HSL	<i>Vibrio anguillarum</i>	Proteases et virulence	(Milton et al. 2001, Milton 2006)
	C6-HSL			
Famille <i>hdtS</i>				
<i>act</i>	C14-HSL	<i>Acidithiobacillus ferrooxydans</i>	Résistance au Cuivre	(Rivas et al. 2007)
	3-OXO-C14-HSL			
	3-OH-C14-HSL			
	3-OH-C14:1-HSL			
<i>hdtS</i>	3-OH-C14:1-HSL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	inconnu	(Laue et al. 2000, Cullinane et al. 2005)
	C10-HSL			
	C6-HSL			
<i>hdtS</i> potentiel	C6-HSL	<i>Nitrosomonas europaea</i>	inconnu	(Burton et al. 2005)
	C8-HSL			
	C10-HSL			
Famille <i>luxI</i>				
<i>rpaI</i>	<i>p</i> -coumaroyl-HSL	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	inconnu	(Schaefer et al. 2008)
		<i>Silicibacter pomeroyi</i>		
<i>braI</i> <i>btaI</i>	cinnamoyl-HSL <i>p</i> -coumaroyl-HSL	<i>Bradyrhizobia</i>	inconnu	(Ahlgren et al. 2011)
<i>bjaI</i>	isovaleryl-HSL	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	inconnu	(Lindemann et al. 2011)
<i>luxI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminescence	(Engebrecht et al. 1983)
<i>vanI</i>	3-OXO-C10-HSL	<i>Vibrio anguillarum</i>	Proteases et virulence	(Milton et al. 1997)
<i>halI</i>	C4-HSL	<i>Halomonas anticariens</i>	inconnu	(Llamas et al. 2005, Tahrioui et al. 2011)
	C6-HSL			
	C8-HSL			
	C12-HSL			
<i>pgaI</i>	3-OH-C10-HSL	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	Synthèse pigments et antibiotiques TDA	(Berger et al. 2011)
<i>luxI1-3</i>	C18-HSL	<i>Dinoroseobacter shibae</i>	Division cellulaire	(Patzelt et al. 2013)
<i>cerI</i>	C14:1-HSL	<i>Rhodobacter</i>	Aggrégation	(Puskas et al. 1997)

		<i>sphaeroïdes</i>		
<i>ssaI</i>	3-OXO-C14-HSL	<i>Silicibacter-Ruegeria</i>	Mobilité	(Zan et al. 2012)
	3-OXO-C16-HSL			
	3-OH-C12-HSL			
<i>ssbI</i>	3-OH-C14-HSL	<i>Silicibacter-Ruegeria</i>	Mobilité	(Zan et al. 2012)
	3-OH-C14:1-HSL			
	3-OH-C13-HSL			
<i>sscI</i>	3-OH-C14-HSL	<i>Silicibacter-Ruegeria</i>	Mobilité	(Zan et al. 2012) (Zan et al. 2015a)
	3-OH-C14:1-HSL			
	3-OH-C13-HSL			
<i>ssiI1</i>	3-OXO-C8-HSL	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	inconnu	(Moran et al. 2004)
	C8-HSL			
<i>ssiI2</i>	C12-HSL	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	inconnu	(Moran et al. 2004)
	C8-HSL			
	C6-HSL			
<i>marI</i>	- longues chaînes acyles(C15-21) HSL - chaînes acyles poly-oxydées	<i>Maribius</i> sp. MOLA 401	inconnu	(Doberva et al. 2014a) Doberva et al in prep
<i>rsaI</i>	- AHL à longues chaînes	<i>Ruegeria halocynthiae</i> R1_13B	inconnu	(Doberva et al. 2014b) Doberva et al in prep
<i>ssaI</i>	3-OXO-C18:1-HSL	<i>Ruegeria halocynthiae</i>	inconnu	(Doberva et al. 2014b) Doberva et al in prep
<i>afeI</i>	3-OH-C8-HSL	<i>Acidithiobacillus ferrooxydans</i>	Résistance au Cuivre	(Farah et al. 2005, Wenbin et al. 2011)
	3-OH-C10-HSL			
	C12-HSL			
	3-OXO-C12-HSL			
	3-OH-C12-HSL			
	3-OH-C16-HSL			
<i>cepl</i>	C8-HSL	<i>Burkholderia cepacia</i>	Facteur de virulence	(Lewenza et al. 1999)
<i>bpsI</i>	C8-HSL	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Facteur de virulence	(Song et al. 2005)
<i>cciI</i>	C6-HSL	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Protéase et swarming	(Malott et al. 2005)
	C8-HSL			
<i>bpmI</i>	C10-HSL	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Facteur de virulence	(Chan et al. 2007)
	3-OH-C8-HSL			
	3-OXO-C10-HSL			
	3-OH-C10-HSL			
	3-OXO-C14-HSL			
<i>bmaI</i>	C8-HSL	<i>Burkholderia mallei</i>	Facteur de virulence	(Majerczyk et al. 2013)
	C10-HSL			
<i>unaI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Burkholderia unamae</i>	Exopolysaccharide	(Suárez-Moreno et al. 2010)
	3-OXO-C8-HSL			

	3-OXO-C10-HSL			
	3-OXO-C12-HSL			
<i>braI</i>	3-OXO-C12-HSL	<i>Burkholderia kururiensis</i>	inconnu	(Suarez-Moreno et al. 2008)
<i>bafl</i>	C6-HSL	<i>Burkholderia ambifaria</i>	Production d'antifongique	(Zhou et al. 2003)
	C8-HSL			
<i>pmII</i>	C10-HSL	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Facteurs de virulence	(Valade et al. 2004)
<i>btaI</i>	C8-HSL	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Exopolysaccharide	(Majerczyk et al. 2014)
	3-OH-C8-HSL			
	3-OH-C10-HSL			
<i>bviI</i>	C6-HSL	<i>Burkholderia vietnamensis</i> et <i>cenocepacia</i>	inconnu	(Malott & Sokol 2007)
	C8-HSL			
	C10-HSL			
<i>bglU</i>	inconnu	<i>Burkholderia glumae</i>	Esseimage	(Nickzad et al. 2015)
<i>tofl</i>	C8-HSL	<i>Burkholderia glumae</i>	Production toxoflavin	(Chen et al. 2012)
<i>raiI</i>	3-OH-C8-HSL	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	limite nodulation (<i>R. elti</i>)	(Sanchez-Contreras et al. 2007)
	C8-HSL	<i>Rhizobium elti</i>		
<i>mrtI</i>	3-OXO-C12-HSL	<i>Mesorhizobium tianshanensis</i>	inconnu	(Zheng et al. 2006)
	3-OXO-C14-HSL			
<i>ngrI</i>	coumestrol dérivé-HSL	<i>Sinorhizobium fredii</i>	Production exopolysaccharide et flagelle	(Schmeisser et al. 2009)
<i>rhiI</i>	C6-HSL	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	croissance/survie association avec légumineuse	(Sanchez-Contreras et al. 2007)
	C7-HSL			
	C8-HSL			
<i>cinI</i>	3-OH-C14:1-HSL	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	favorise survie en cas de pénurie régule <i>rhiI/traI/raiI</i>	(Sanchez-Contreras et al. 2007)
<i>sinI</i>	C8-HSL	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	initiation des nodules	(Gao et al. 2005)
	C12-HSL			
	3-OXO-C10-HSL			
	3-OXO-C14-HSL			
	C16-HSL			
	3-OXO-C16-HSL			
	C16:1-HSL			
	3-OXO-C16:1-HSL			
<i>traI</i>	3-OXO-C8-HSL	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Transfert conjugatif	(Sanchez-Contreras et al. 2007)
		<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
		<i>Sinorhizobium fredii</i>		
<i>avsl</i>	C16-HSL	<i>Agrobacterium vitis</i>	Nécrose	(Hao & Burr 2006)
	3-OXO-C12-HSL			

	3-OXO-C14:1-HSL			
	3-OXO-C16:1-HSL			
	C16:1-HSL			
	C18-HSL			
<i>patI</i>	inconnu	<i>Pseudomonas atlantica</i>	inconnu	soumission directe GenBank: ABG38892.1
<i>pcrI</i>	C6-HSL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	biofilm	(Wei & Zhang 2006)
	C8-HSL			
	3-OXO-C6-HSL			
	3-OXO-C8-HSL			
<i>cmrI</i>	3-OH-C12-HSL	<i>Pseudomonas</i>	inconnu	(De Maeyer et al. 2011)
<i>psyI</i>	C6-HSL	<i>Pseudomonas syringae</i>	Esseimage	(Taguchi et al. 2006)
	3-OXO-C6-HSL			
<i>lasI</i>	3-OXO-C12-HSL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Formation biofilm Production elastase	(Venturi 2006)
<i>ppuI</i>	3-OXO-C10-HSL	<i>Pseudomonas putida</i>	Formation biofilm	(Venturi 2006)
	3-OXO-C12-HSL			
<i>mupI</i>	3-OXO-C12-HSL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Production de Mupirocine	(Venturi 2006) (Hothersall et al. 2011)
<i>csaI</i>	C6-HSL	<i>Pseudomonas aerofasciens</i>	Production phénazine	(Venturi 2006) (Veselova et al. 2008)
	C4-HSL			
	3-OXO-C6-HSL			
<i>phzI</i>	C6-HSL	<i>Pseudomonas chlororaphis aerofasciens</i>	Production phénazine	(De Maeyer et al. 2011)
<i>rhII</i>	C4-HSL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Facteur de virulence	(Venturi 2006)
<i>ahII</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Pseudomonas syringae</i>	Aggrégation cellulaire	(Venturi 2006)
<i>yspI</i>	3-OXO-C8-HSL	<i>Yersinia pestis</i>	Mobilité et esseimage	(Kirwan et al. 2006)
	3-OXO-C6-HSL			
<i>ypeI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Yersinia pestis</i>	Mobilité et esseimage	(Kirwan et al. 2006)
<i>ypsI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Mobilité et esseimage	(Kirwan et al. 2006) (Atkinson et al. 1999)
	C6-HSL			
<i>ytlI</i>	C8-HSL	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Mobilité et esseimage	(Kirwan et al. 2006) (Atkinson et al. 1999)
	C6-HSL			
<i>yenI</i>	C6-HSL	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Facteur de virulence	(Throup et al. 1995) (Nguyen et al. 2013)
	3-OXO-C6-HSL			
<i>yukI</i>	3-OXO-C8-HSL	<i>Yersinia ruckeri</i>	inconnu	(Kastbjerg et al.

<i>yukI</i>	3-OXO-C8-HSL		inconnu	2007)
	3-OXO-C7-HSL			
	3-OXO-C9-HSL			
	3-OH-C8-HSL			
	3-OXO-C10-HSL			
	3-OXO-C6-HSL			
	C8-HSL			
	C10-HSL			
<i>yruI</i>	C6-HSL	<i>Yersinia ruckeri</i>	inconnu	(Kastbjerg et al. 2007)
	3-OXO-C6-HSL			
	C8-HSL			
<i>hslI</i>	3-OXO-C8-HSL	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Enzymes extracellulaires	(Crépin et al. 2011)
	C8-HSL			
	3-OXO-C10-HSL			
	3-OXO-C6-HSL			
<i>expI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Erwinia carotovora</i> <i>Erwinia chrysanthemi</i>	Sécrétion d'enzyme	(Miller & Bassler 2001a)
<i>carI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Erwinia/</i> <i>Pectobacterium carotovora</i> <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Synthèse d'antibiotique type carbapenem	(Miller & Bassler 2001a)
<i>eagI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Pantoea/Enterobacter agglomerans</i>	inconnu	(Swift et al. 1993)
<i>pagI</i>	C4-HSL	<i>Pantoea agglomerans vagans</i>	Facteurs de virulence	(Maayer et al. 2012) (Barash & Manulis-Sasson 2009)
	C6-HSL			
<i>eanI</i>	C6-HSL	<i>Pantoea ananatis</i>	Synthèse exopolysaccharides	(Morohoshi et al. 2007)
	3-OXO-C6-HSL			
<i>esaI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Pantoea stewartii</i>	Synthèse exopolysaccharides	(Bodman et al. 1998)
	3-OXO-C8-HSL			
<i>ahyI</i>	C4-HSL	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Synthèse de protéase	(Swift et al. 1997)
	C6-HSL			
<i>asaI</i>	C4-HSL	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Synthèse de protéase	(Swift et al. 1997)
	C6-HSL			
<i>cviI</i>	C6-HSL	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Production de pigments	(Morohoshi et al. 2008)
<i>edwI</i>	C7-HSL	<i>Edwardsiella tarda</i>	Facteurs de virulence	(Morohoshi et al. 2004)
	C6-HSL			
<i>croI</i>	C4-HSL	<i>Citrobacter rodentium</i>	Adhérence aux surfaces	(Coulthurst et al. 2007)
	C6-HSL			
	3-OXO-C6-HSL			
<i>swrI</i>	C4-HSL	<i>Serratia liquefaciens</i>	Formation de biofilm	(Labbate et al. 2004)
	C6-HSL			

<i>sprI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Serratia proteamaculans</i>	Production d'enzymes extracellulaires	(Christensen 2003)
<i>spII</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Serratia plymuthica</i>	Fermentation	(Houdt et al. 2006)
<i>spsI</i>	C7-HSL	<i>Serratia plymuthica</i>	Mobilité et formation de biofilm	(Liu et al. 2011)
	C6-HSL			
	C5-HSL			
	C4-HSL			
	3-OXO-C7-HSL			
	3-OXO-C6-HSL			
	3-OH-C6-HSL			
<i>spnI</i>	C6-HSL	<i>Serratia marcescens</i>	Mobilité	(Horng et al. 2002)
	3-OXO-C6-HSL			
<i>smalI</i>	C4-HSL	<i>Serratia marcescens</i>	Synthèse de carbapenem et pigments	(Thomson et al. 2000)
	C6-HSL			
<i>bruI</i>	C6-HSL	<i>Brenneria rubifaciens</i>	Synthèse de pigment	(McClean et al. 2012)
	3-OXO-C6-HSL			
<i>halI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Hafnia alvei</i>	inconnu	(Bruhn et al. 2004)
<i>alpI</i>	3-OXO-C6-HSL	<i>Azospirillum lipoferum</i> TVV3/ B518	Adaptation à la vie en association avec les racines des plantes	(Vial et al. 2006) (Boyer et al. 2008)
	C6-HSL			
	3-OXO-C8-HSL			
	3-OH-C8-HSL			
	C8-HSL			
	C10-HSL			
	3-OXO-C10-HSL			
<i>aqsI</i>	3-HO-C12-HSL	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	Formation de biofilm et dégradation d'hexadecane	(Kim & Park 2013)
	3-OH-C12-HSL			
<i>abaI</i>	3-OH-C12-HSL	<i>Acinetobacter baumani</i>	Formation de biofilm	(Niu et al. 2008)
<i>soII</i>	C6-HSL	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Facteur de virulence	(Flavier et al. 1997)
	C8-HSL			
<i>mliI</i>	C14:1-HSL	<i>Methylobacterium extorquens</i>	inconnu	(Nieto Penalver et al. 2006a) (Poonguzhali et al. 2007)
	C14:2-HSL			
<i>msaI</i>	C6-HSL	<i>Methylobacterium extorquens</i>	inconnu	(Nieto Penalver et al. 2006a) (Poonguzhali et al. 2007)
	C8-HSL			
<i>tsII</i>	inconnu	<i>Methylobacterium extorquens</i>	Production de carbohydrate extracellulaire et régulation <i>msaI</i> et <i>mliI</i>	(Nieto Penalver et al. 2006b)

Tableau 17 : Souches bactériennes issues de la collection MOLA criblées pour l'émission d'AI-1. En rose les souches positives, en bleu les souches bioluminescentes.

<i>Vibrionaceae</i>		
ID	Genre	espèce
33	<i>Enterovibrio</i>	<i>norvegicus</i>
61	<i>Photobacterium</i>	<i>leiognathi</i>
62	<i>Vibrio</i>	<i>campbellii</i>
65	<i>Vibrio</i>	<i>ponticus</i>
66	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
67	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
76	<i>Vibrio</i>	<i>pectenicida</i>
113	<i>Vibrio</i>	<i>calviensis</i>
165	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
201	<i>Photobacterium</i>	<i>leiognathi</i>
219	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
222	<i>Vibrio</i>	<i>shilonii</i>
239	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
273	<i>Enterovibrio</i>	<i>norvegicus</i>
343	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
396	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
416	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
439	<i>Photobacterium</i>	<i>leiognathi</i>
489	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
490	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
491	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
493	<i>Vibrio</i>	<i>hepatarius</i>
494	<i>Vibrio</i>	<i>hepatarius</i>
495	<i>Vibrio</i>	<i>lentus</i>
496	<i>Vibrio</i>	<i>neptunius</i>
497	<i>Vibrio</i>	<i>neptunius</i>
498	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
499	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
500	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
502	<i>Vibrio</i>	<i>pomeroi</i>
503	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
504	<i>Photobacterium</i>	<i>aplysiae</i>
505	<i>Photobacterium</i>	<i>aplysiae</i>
526	<i>Vibrio</i>	<i>tasmaniensis</i>
527	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
528	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
529	<i>Vibrio</i>	<i>tapetis</i>
530	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
532	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
537	<i>Listonella</i>	<i>anguillarum</i>
544	<i>Vibrio</i>	<i>neptunius</i>

546	<i>Vibrio</i>	<i>alginolyticus</i>
558	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
569	<i>Listonella</i>	<i>anguillarum</i>
569	<i>Listonella</i>	<i>anguillarum</i>
576	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
578	<i>Vibrio</i>	<i>neptunius</i>
579	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
580	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
582	<i>Enterovibrio</i>	<i>norvegicus</i>
583	<i>Vibrio</i>	<i>chagasii</i>
586	<i>Vibrio</i>	<i>chagasii</i>
594	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
595	<i>Vibrio</i>	<i>chagasii</i>
596	<i>Vibrio</i>	<i>coralliilyticus</i>
604	<i>Vibrio</i>	<i>neptunius</i>
605	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
615	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
616	<i>Vibrio</i>	<i>coralliilyticus</i>
620	<i>Vibrio</i>	<i>neptunius</i>
625	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
626	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
640	<i>Vibrio</i>	<i>chagasii</i>
643	<i>Enterovibrio</i>	<i>norvegicus</i>
668	<i>Vibrio</i>	<i>nigripulchritudo</i>
679	<i>Vibrio</i>	<i>shilonii</i>
683	<i>Vibrio</i>	<i>alginolyticus</i>
707	<i>Vibrio</i>	<i>fischeri</i>
717	<i>Photobacterium</i>	<i>leiognathi</i>
724	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
736	<i>Vibrio</i>	<i>parahaemolyticus</i>
745	<i>Photobacterium</i>	<i>angustum</i>
850	<i>Vibrio</i>	<i>lentus</i>
851	<i>Vibrio</i>	<i>lentus</i>
852	<i>Vibrio</i>	<i>splendidus</i>
853	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
897	<i>Vibrio</i>	<i>communis</i>
899	<i>Vibrio</i>	<i>communis</i>
900	<i>Vibrio</i>	<i>campbellii</i>
901	<i>Vibrio</i>	<i>tubiashii</i>
911	<i>Vibrio</i>	<i>campbellii</i>
912	<i>Vibrio</i>	<i>tubiashii</i>
916	<i>Vibrio</i>	<i>communis</i>
942	<i>Vibrio</i>	<i>tubiashii</i>
947	<i>Vibrio</i>	<i>harveyi</i>
955	<i>Vibrio</i>	<i>owensii</i>
958	<i>Vibrio</i>	<i>nigripulchritudo</i>
973	<i>Vibrio</i>	<i>owensii</i>
974	<i>Vibrio</i>	<i>tubiashii</i>

1015	<i>Vibrio</i>	<i>ordalii</i>
1026	<i>Vibrio</i>	<i>metschnikovii</i>
1055	<i>Vibrio</i>	<i>metschnikovii</i>
1143	<i>Vibrio</i>	<i>owensii</i>
1169	<i>Vibrio</i>	<i>owensii</i>
1228	<i>Vibrio</i>	<i>azureus</i>
1230	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
1231	<i>Vibrio</i>	<i>fortis</i>
1232	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
1233	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
1237	<i>Vibrio</i>	<i>azureus</i>
1238	<i>Vibrio</i>	<i>azureus</i>
1955	<i>Vibrio</i>	<i>owensii</i>
1958	<i>Vibrio</i>	<i>breoganii</i>
1962	<i>Vibrio</i>	<i>pomeroi</i>
1966	<i>Vibrio</i>	<i>sagamiensis</i>
1971	<i>Vibrio</i>	<i>pectenicida</i>
1972	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
1973	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
1974	<i>Vibrio</i>	<i>sagamiensis</i>
1980	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
1982	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
1986	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
1989	<i>Vibrio</i>	<i>gigantis</i>
EF (-1) 5	<i>Photobacterium</i>	<i>halotolerans</i>
LWfA 2	<i>Vibrio</i>	<i>diazotrophicus</i>
Phospho ANT 2200	<i>Photobacterium</i>	<i>phosphoreum</i>

<i>Rhodobacteraceae</i>		
ID	Genre	espèce
7	<i>Celeribacter</i>	<i>neptunius</i>
8	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
11	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
13	<i>Marivita</i>	<i>cryptomonadis</i>
18	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
22	<i>Paracoccus</i>	<i>yeei</i>
63	<i>Paracoccus</i>	<i>marcusii</i>
84	<i>Thalassobaculum</i>	<i>litoreum</i>
85	<i>Celeribacter</i>	<i>neptunius</i>
94	<i>Roseovarius</i>	<i>pacificus</i>
97	<i>Celeribacter</i>	<i>baekdonensis</i>
98	<i>Litoreibacter</i>	<i>janthinus</i>
99	<i>Roseovarius</i>	<i>crassostreae</i>
102	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
106	<i>Antarctobacter</i>	<i>heliothermus</i>
108	<i>Planktomarina</i>	<i>temperata</i>
130	<i>Celeribacter</i>	<i>neptunius</i>

152	<i>Phaeobacter</i>	<i>arcticus</i>
174	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>
175	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>
191	<i>Paracoccus</i>	<i>aminophilus</i>
192	<i>Paracoccus</i>	<i>marcusii</i>
197	<i>Stappia</i>	<i>alba</i>
226	<i>Pelagibaca</i>	<i>bermudensis</i>
233	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
238	<i>Thalassobacter</i>	<i>stenotrophicus</i>
246	<i>Nereida</i>	<i>ignava</i>
253	<i>Paracoccus</i>	<i>homiensis</i>
283	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
285	<i>Phaeobacter</i>	<i>gallaeciensis</i>
287	<i>Loktanella</i>	<i>marincola</i>
300	<i>Paracoccus</i>	<i>marinus</i>
309	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
317	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
318	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
320	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>
322	<i>Litoreibacter</i>	<i>albidus</i>
324	<i>Paracoccus</i>	<i>yeei</i>
325	<i>Paracoccus</i>	<i>alcaliphilus</i>
327	<i>Pseudoruegeria</i>	<i>aquimaris</i>
328	<i>Marivita</i>	<i>cryptomonadis</i>
329	<i>Paracoccus</i>	<i>alcaliphilus</i>
337	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
338	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
341	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>
342	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
344	<i>Litoreibacter</i>	<i>albidus</i>
346	<i>Paracoccus</i>	<i>yeei</i>
347	<i>Oceanibulbus</i>	<i>indoliflex</i>
348	<i>Oceanibulbus</i>	<i>indoliflex</i>
349	<i>Thalassobius</i>	<i>mediterraneus</i>
350	<i>Oceanibulbus</i>	<i>indoliflex</i>
351	<i>Oceanibulbus</i>	<i>indoliflex</i>
354	<i>Oceanibulbus</i>	<i>indoliflex</i>
355	<i>Oceanibulbus</i>	<i>indoliflex</i>
356	<i>Sulfitobacter</i>	<i>mediterraneus</i>
361	<i>Roseovarius</i>	<i>crassostreae</i>
366	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>
367	<i>Ruegeria</i>	<i>pelagia</i>
371	<i>Jannaschia</i>	<i>donghaensis</i>
373	<i>Jannaschia</i>	<i>pohangensis</i>
381	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
391	<i>Oceanicola</i>	<i>marinus</i>
393	<i>Oceanicola</i>	<i>marinus</i>
399	<i>Marinovum</i>	<i>algicola</i>

401	<i>Maribius</i>	<i>bermudensis</i>
420	<i>Citricella</i>	<i>thiooxidans</i>
426	<i>Rhodobacter</i>	<i>aestuarii</i>
428	<i>Marivita</i>	<i>cryptomonadis</i>
435	<i>Rhodobacter</i>	<i>vinaykumaraii</i>
438	<i>Rhodobacter</i>	<i>vinaykumaraii</i>
442	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>
443	<i>Marivita</i>	<i>cryptomonadis</i>
445	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>
447	<i>Rhodobacter</i>	<i>vinaykumaraii</i>
449	<i>Rhodobacter</i>	<i>massiliensis</i>
511	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
513	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
539	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
545	<i>Thalassobacter</i>	<i>stenotrophicus</i>
547	<i>Thalassobius</i>	<i>mediterraneus</i>
553	<i>Loktanella</i>	<i>hongkongensis</i>
554	<i>Pseudorhodobacter</i>	<i>ferrugineus</i>
555	<i>Marinovum</i>	<i>algicola</i>
562	<i>Loktanella</i>	<i>rosea</i>
568	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
591	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
599	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
610	<i>Marinovum</i>	<i>algicola</i>
614	<i>Pelagibaca</i>	<i>bermudensis</i>
619	<i>Pelagibaca</i>	<i>bermudensis</i>
629	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
645	<i>Thalassobius</i>	<i>aestuarii</i>
649	<i>Dinoroseobacter</i>	<i>shibae</i>
651	<i>Marivita</i>	<i>cryptomonadis</i>
652	<i>Phaeobacter</i>	<i>gallaeciensis</i>
654	<i>Phaeobacter</i>	<i>gallaeciensis</i>
675	<i>Nesiotobacter</i>	<i>exalbescens</i>
686	<i>Paracoccus</i>	<i>aestuarii</i>
695	<i>Paracoccus</i>	<i>homiensis</i>
697	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
703	<i>Thioclava</i>	<i>pacifica</i>
706	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
725	<i>Pseudovibrio</i>	<i>denitrificans</i>
733	<i>Paracoccus</i>	<i>zeaxanthinifaciens</i>
769	<i>Sulfitobacter</i>	<i>marinus</i>
810	<i>Sulfitobacter</i>	<i>marinus</i>
823	<i>Octadecabacter</i>	<i>arcticus</i>
840	<i>Sulfitobacter</i>	<i>delicatus</i>
843	<i>Sulfitobacter</i>	<i>delicatus</i>
859	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>
860	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>
861	<i>Nautella</i>	<i>italica</i>

871	<i>Gaetbulicola</i>	<i>byunsanensis</i>
872	<i>Gaetbulicola</i>	<i>byunsanensis</i>
877	<i>Ruegeria</i>	<i>scottomollicae</i>
878	<i>Phaeobacter</i>	<i>caeruleus</i>
879	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
880	<i>Gaetbulicola</i>	<i>byunsanensis</i>
881	<i>Celeribacter</i>	<i>neptunius</i>
882	<i>Loktanella</i>	<i>hongkongensis</i>
888	<i>Phaeobacter</i>	<i>arcticus</i>
889	<i>Phaeobacter</i>	<i>gallaeciensis</i>
895	<i>Labrenzia</i>	<i>aggregata</i>
896	<i>Ruegeria</i>	<i>lacuscaerulensis</i>
898	<i>Ruegeria</i>	<i>lacuscaerulensis</i>
902	<i>Ruegeria</i>	<i>lacuscaerulensis</i>
903	<i>Ruegeria</i>	<i>lacuscaerulensis</i>
904	<i>Ruegeria</i>	<i>lacuscaerulensis</i>
908	<i>Ruegeria</i>	<i>lacuscaerulensis</i>
915	<i>Ruegeria</i>	<i>lacuscaerulensis</i>
920	<i>Roseibacterium</i>	<i>elongatum</i>
921	<i>Loktanella</i>	<i>hongkongensis</i>
922	<i>Marivita</i>	<i>byusanensis</i>
928	<i>Ruegeria</i>	<i>lacuscaerulensis</i>
954	<i>Ruegeria</i>	<i>lacuscaerulensis</i>
976	<i>Paracoccus</i>	<i>zeaxanthinifaciens</i>
992	<i>Sulfitobacter</i>	<i>delicatus</i>
1002	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
1009	<i>Lentibacter</i>	<i>algarum</i>
1011	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
1013	<i>Loktanella</i>	<i>vestfoldensis</i>
1103	<i>Rhodobaca</i>	<i>bogoriensis</i>
1105	<i>Rhodobaca</i>	<i>bogoriensis</i>
1144	<i>Ruegeria</i>	<i>mobilis</i>
1145	<i>Labrenzia</i>	<i>alexandrii</i>
1146	<i>Labrenzia</i>	<i>alexandrii</i>
1152	<i>Ruegeria</i>	<i>mobilis</i>
1153	<i>Ruegeria</i>	<i>mobilis</i>
1154	<i>Ruegeria</i>	<i>mobilis</i>
1155	<i>Maritimibacter</i>	<i>alkaliphilus</i>
1156	<i>Maritimibacter</i>	<i>alkaliphilus</i>
1157	<i>Thalassobius</i>	<i>aestuarii</i>
1160	<i>Ruegeria</i>	<i>halocynthiae</i>
1176	<i>Maritimibacter</i>	<i>alkaliphilus</i>
1181	<i>Poseidonocella</i>	<i>sedimentorum</i>
1199	<i>Labrenzia</i>	<i>alexandrii</i>
1225	<i>Thalassomonas</i>	<i>ganghwensis</i>
1226	<i>Thalassomonas</i>	<i>ganghwensis</i>
1227	<i>Thalassomonas</i>	<i>ganghwensis</i>
1239	<i>Phaeobacter</i>	<i>arcticus</i>

1328	<i>Paracoccus</i>	<i>caeni</i>
1331	<i>Defluviimonas</i>	<i>denitrificans</i>
1390	<i>Paracoccus</i>	<i>caeni</i>
1393	<i>Paracoccus</i>	<i>caeni</i>
1399	<i>Defluviimonas</i>	<i>denitrificans</i>
1411	<i>Loktanella</i>	<i>hongkongensis</i>
1436	<i>Sulfitobacter</i>	<i>brevis</i>
1440	<i>Litoreibacter</i>	<i>janthinus</i>
1442	<i>Litoreibacter</i>	<i>janthinus</i>
1443	<i>Jannaschia</i>	<i>pohangensis</i>
1457	<i>Sulfitobacter</i>	<i>brevis</i>
1458	<i>Sulfitobacter</i>	<i>brevis</i>
1466	<i>Sulfitobacter</i>	<i>marinus</i>
1494	<i>Sulfitobacter</i>	<i>brevis</i>
1495	<i>Sulfitobacter</i>	<i>brevis</i>
1498	<i>Maribius</i>	<i>pelagius</i>
1499	<i>Jannaschia</i>	<i>pohangensis</i>
1502	<i>Litoreibacter</i>	<i>janthinus</i>
1513	<i>Litoreibacter</i>	<i>janthinus</i>
1951	<i>Phaeobacter</i>	<i>gallaeciensis</i>
1957	<i>Phaeobacter</i>	<i>gallaeciensis</i>
A MA (N) 5m 1	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
A MA (N) 5m 5	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
A ZY Fd 1	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
A ZY Fd 6	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
B MA (-2) Fond 12	<i>Ruegeria</i>	<i>mobilis</i>
B MA (N) 150m 8	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
B MA (N) 5m 12	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
B ZG 125m 2	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
B ZG 5m 3	<i>Citreicella</i>	<i>thiooxidans</i>
B ZY 150m 10	<i>Oceanicola</i>	<i>batsensis</i>
B ZY 150m 5	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
B ZY 5m 4	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
C MA (-1) 5m 13	<i>Oceanibulbus</i>	<i>indolifex</i>
C MA (N) 5m 5	<i>Pelagibaca</i>	<i>bermudensis</i>
C MA (N) DCM+ 4	<i>Saemankumia</i>	<i>lutimaris</i>
C ZG 50m 7	<i>Marinovum</i>	<i>algicola</i>
C ZG DCM 3	<i>Paracoccus</i>	<i>alcaliphilus</i>
C ZG DCM- 1	<i>Marinovum</i>	<i>algicola</i>
C ZY 200m 5	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
C ZY 5m 6	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
C ZY DCM- 7	<i>Citreicella</i>	<i>thiooxidans</i>
C ZY Fd 6	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
DM (-3) 16	<i>Ruegeria</i>	<i>mobilis</i>
DSM6996	<i>Roseobacter</i>	<i>littoralis</i>
LD2 (-1) R15	<i>Citreicella</i>	<i>thiooxidans</i>
LD2(-1) R1b	<i>Paracoccus</i>	<i>aestuarii</i>
LD2(-1) R1bbis	<i>Paracoccus</i>	<i>aminovorans</i>

LDC (N) P19	<i>Sulfitobacter</i>	<i>mediterraneus</i>
LDC (N) P21	<i>Octadecabacter</i>	<i>antarcticus</i>
LMA (-1) 19	<i>Oceanicola</i>	<i>granulosus</i>
LMA (-2) 17	<i>Sulfitobacter</i>	<i>delicatus</i>
LMA (-3) 26	<i>Dinoroseobacter</i>	<i>shibae</i>
LMA (-3) 28	<i>Oceanibulbus</i>	<i>indolifex</i>
LMA(-2) 8	<i>Loktanella</i>	<i>rosea</i>
LMdA (-2) 2	<i>Maritimibacter</i>	<i>alkaliphilus</i>
LMdA (-2) 5	<i>Roseovarius</i>	<i>tolerans</i>
LMdP (-1) 11	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
LMP (-3) 5	<i>Thalassobacter</i>	<i>stenotrophicus</i>
LRP (-1) 4	<i>Paracoccus</i>	<i>seriniphilus</i>
MT0 10	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 12a	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT0 12b	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT0 12c	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT0 14a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 14b	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 14c	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 15a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 15c	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 16	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 17	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT0 1a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 1b	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 1c	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 2a	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT0 2b	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT0 2c	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT0 5a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 5b	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 5c	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT0 6a	<i>Labrenzia</i>	<i>aggregata</i>
MT0 8a	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT0 8b	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT0 8c	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
MT1 1a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT1 1c	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT1 2a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT1 5a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT1 5b	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT1 6a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT1 6b	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
MT1 6c	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT0 11	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
RT0 4a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT0 4b	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT0 4c	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>

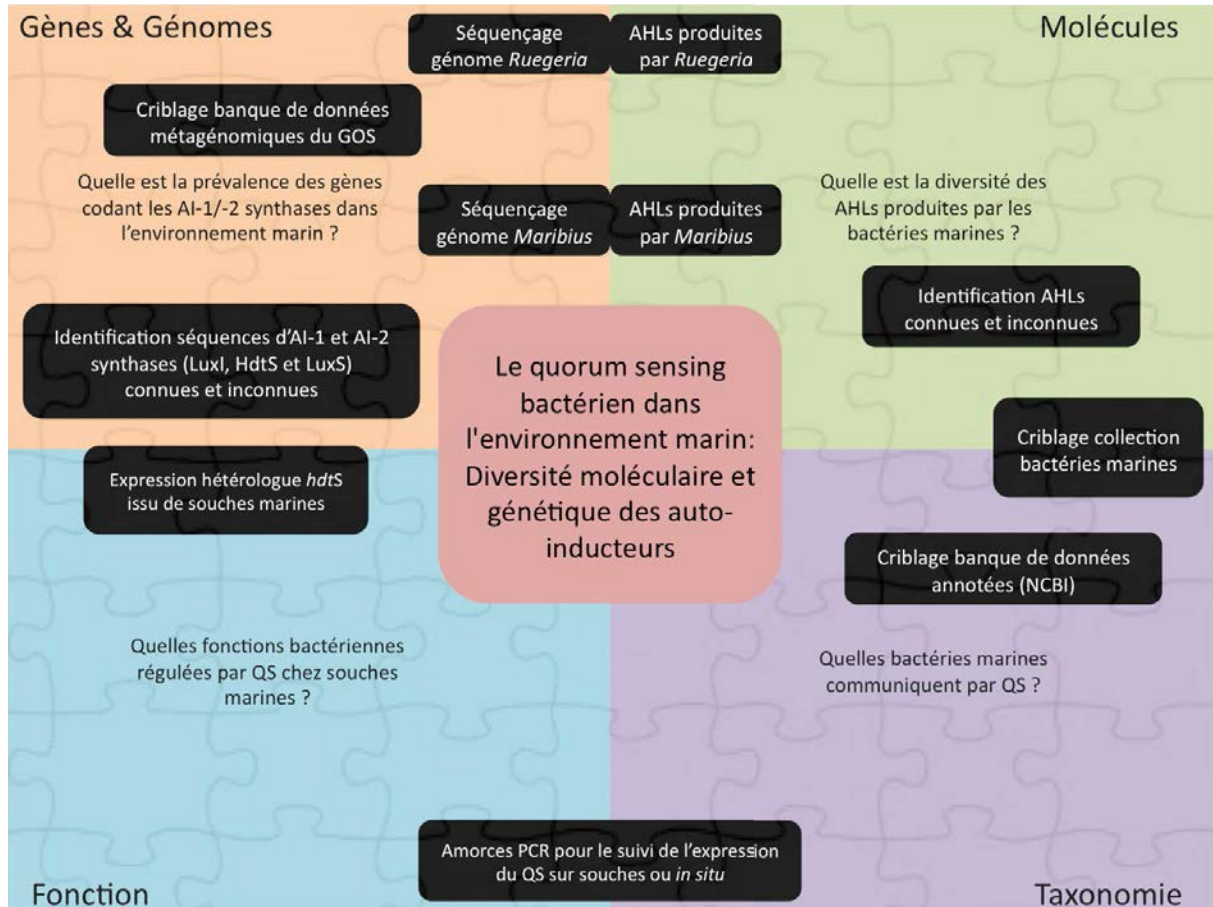
RT0 5b	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT0 5c	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT0 7a	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
RT0 7b	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
RT0 7c	<i>Ruegeria</i>	<i>atlantica</i>
RT0 8	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT1 1b	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT1 3a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT1 3c	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT1 5a	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
RT1 5b	<i>Pseudovibrio</i>	<i>ascidiaceicola</i>
S1 MA (N) 5m 1	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
S13 MA 5m 4	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
S13 MA 5m 5	<i>Pelagibaca</i>	<i>bermudensis</i>
S13 MA DCM 6	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
S13 MA DCM 9	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
S13 ZG DCM 4	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
S13 ZG DCM 5	<i>Sulfitobacter</i>	<i>pontiacus</i>
S13 ZG 5m 5	<i>Pelagibaca</i>	<i>bermudensis</i>
S17 MA DCM 6	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
S17 ZG 5m 1	<i>Pelagibaca</i>	<i>bermudensis</i>
S5 MA (N) DCM 5	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>
S7 MA (-2) 5m 15	<i>Paracoccus</i>	<i>yeei</i>
S9 MA (N) DCM 3	<i>Sulfitobacter</i>	<i>dubius</i>

<i>Erythrobacteraceae</i>		
ID	Genre	espèce
12	<i>Erythrobacter</i>	<i>citreus</i>
90	<i>Erythrobacter</i>	<i>vulgaris</i>
234	<i>Erythrobacter</i>	<i>litoralis</i>
265	<i>Porphyrobacter</i>	<i>sanguineus</i>
267	<i>Porphyrobacter</i>	<i>sanguineus</i>
333	<i>Altererythrobacter</i>	<i>luteolus</i>
368	<i>Erythrobacter</i>	<i>flavus</i>
376	<i>Erythrobacter</i>	<i>aquimaris</i>
427	<i>Erythrobacter</i>	<i>longus</i>
456	<i>Erythrobacter</i>	<i>flavus</i>
557	<i>Erythrobacter</i>	<i>longus</i>
561	<i>Erythrobacter</i>	<i>seohaensis</i>
564	<i>Erythrobacter</i>	<i>flavus</i>
565	<i>Erythrobacter</i>	<i>flavus</i>
575	<i>Erythrobacter</i>	<i>gaetbuli</i>
608	<i>Erythrobacter</i>	<i>gaetbuli</i>
609	<i>Erythrobacter</i>	<i>gaetbuli</i>
633	<i>Erythrobacter</i>	<i>citreus</i>
674	<i>Erythrobacter</i>	<i>citreus</i>
698	<i>Erythrobacter</i>	<i>vulgaris</i>

704	<i>Erythrobacter</i>	<i>citreus</i>
721	<i>Erythrobacter</i>	<i>flavus</i>
971	<i>Erythrobacter</i>	<i>vulgaris</i>
986	<i>Erythrobacter</i>	<i>vulgaris</i>
1025	<i>Porphyrobacter</i>	<i>tepidarius</i>
1150	<i>Altererythrobacter</i>	<i>ishigakiensis</i>
1151	<i>Altererythrobacter</i>	<i>ishigakiensis</i>
1158	<i>Erythrobacter</i>	<i>aquimaris</i>
1343	<i>Erythrobacter</i>	<i>seohaensis</i>
1394	<i>Erythrobacter</i>	<i>nanhaisediminis</i>
1429	<i>Altererythrobacter</i>	<i>namhicola</i>
1430	<i>Altererythrobacter</i>	<i>namhicola</i>
1456	<i>Porphyrobacter</i>	<i>sanguineus</i>
B ZG 5m 4	<i>Erythrobacter</i>	<i>citreus</i>
C5 (-3) MA 17	<i>Erythrobacter</i>	<i>gaetbuli</i>
C6 P 3c	<i>Croceicoccus</i>	<i>marinus</i>
C6 S3 3a	<i>Croceicoccus</i>	<i>marinus</i>
L18	<i>Porphyrobacter</i>	<i>dokdonensis</i>
LD2 (-1) M27	<i>Erythrobacter</i>	<i>aquimaris</i>
LD2 (-1) R12	<i>Erythrobacter</i>	<i>aquimaris</i>
LD2(-1) P7	<i>Erythrobacter</i>	<i>longus</i>
LMA (-1) 21	<i>Erythrobacter</i>	<i>longus</i>
LMA (-2) 23	<i>Erythrobacter</i>	<i>longus</i>
LMA (-2) 24	<i>Erythrobacter</i>	<i>longus</i>
LMdA (-2) 3	<i>Erythrobacter</i>	<i>longus</i>

<i>Sphingomonadaceae</i>		
ID	Genre	espèce
26	<i>Sphingobium</i>	<i>olei</i>
27	<i>Sphingobium</i>	<i>rhizovicinum</i>
39	<i>Sphingobium</i>	<i>lactosutens</i>
41	<i>Sphingobium</i>	<i>lactosutens</i>
46	<i>Sphingopyxis</i>	<i>witflariensis</i>
134	<i>Citromicrobium</i>	<i>bathyomarinum</i>
516	<i>Sphingopyxis</i>	<i>macrogoltabida</i>
518	<i>Novosphingobium</i>	<i>taihuense</i>
1451	<i>Sphingomicrobium</i>	<i>lutaoense</i>
1452	<i>Sphingomicrobium</i>	<i>lutaoense</i>
1453	<i>Sphingomicrobium</i>	<i>lutaoense</i>
1454	<i>Sphingomicrobium</i>	<i>lutaoense</i>

Schéma bilan de cette thèse de doctorat



Résumé dans la langue de Molière :

Le quorum sensing bactérien dans l'environnement marin: Diversité moléculaire et génétique des auto-inducteurs

L'environnement marin est constitué d'écosystèmes nombreux et variés, qui sont habités par des organismes appartenant aux trois domaines du vivant dont celui des bactéries. Les bactéries marines sont ubiquistes, elles ont colonisé les divers habitats marins. La majorité des bactéries marines connues appartient à l'embranchement des *Proteobacteria*. Le caractère unicellulaire des bactéries n'en fait pas pour autant un type d'organisme qui vit de manière isolé. En effet ces micro-organismes vivent en communauté, et ils coopèrent. Cette coopération est basée sur un mécanisme moléculaire appelé quorum sensing (QS). Ce système est dépendant de la densité cellulaire de la communauté, ce qui permet aux bactéries de synchroniser leur expression génétique, pour coordonner certaines de leurs activités physiologiques telles que la production de biofilms, l'émission de bioluminescence ou encore la synthèse de facteurs de virulence. Ce mécanisme est basé sur la biosynthèse et la réception de molécules signal. Les bactéries produisent plusieurs types de molécules signal dont les acyl-homoserines lactones (AHLs), aussi appelées auto-inducteur de type 1 (AI-1) qui sont synthétisées par l'embranchement des *Proteobacteria*. L'enzyme clé de la voie de biosynthèse des AI-1 est codée par trois familles de gènes *luxI*, *ainS* et *hdtS*. D'autres molécules signal telles que le furanosyl diester borate (AI-2) sont produites par une plus grande diversité taxonomique de bactéries. Le gène codant l'enzyme clé de la voie de biosynthèse des AI-2 est *luxS*. La majorité des recherches dans le domaine du QS s'est portée sur des modèles bactériens d'intérêt biomédical ou agronomique. Cependant, l'importance du QS chez les bactéries d'intérêt environnemental reste mal connue, et en particulier en le milieu marin. Ce travail de thèse se concentre sur trois questions : Quelle est la diversité taxonomique et moléculaire des bactéries marines cultivables communiquant grâce au mécanisme de QS basé sur les AI-1? Quelle est la prévalence du QS basé sur les AI-1 et -2 chez les bactéries (cultivables et non-cultivables) marines? Quel est le rôle fonctionnel du QS chez les *Roseobacter* dans l'environnement marin ? Pour aborder la première question nous avons utilisé la collection de bactéries marines MOLA qui regroupe des souches issues des différents écosystèmes marins et de diverses zones géographiques. Cette étude basée sur des techniques de chimie des substances naturelles a permis de mettre en exergue des souches bactériennes originales comme *Maribius sp* MOLA 401 entre autres, produisant un très grand nombre d'AHLs avec de nouvelles structures. Pour traiter le second axe nous nous sommes appuyés sur des méthodes de bio-informatique pour réaliser le criblage du métagénome marin du Global Ocean Sampling pour la recherche de gènes *luxI*, *ainS*, *hdtS* et *luxS*. Ce travail a révélé l'existence d'un très grand nombre de séquences d'autoinducteur synthèses nouvelles dans l'écosystème marin. L'ensemble de ces données sur la diversité, l'abondance et la répartition biogéographique des AI-1 dans l'écosystème marin suggère une forte importance des mécanismes du QS à l'œuvre dans les communautés bactériennes marines naturelles.

Mots-clés : Quorum sensing / Acyl-homoserine lactone / Métagénomique environnementale / Biodiversité / Écosystème marin / Global Ocean Sampling / Molécules signal / Protéobactéries marines / Chimie des substances naturelles

Abstract in the Shakespeare's language:

Bacterial quorum sensing in marine environment : Autoinducers molecular and genetic diversity

The marine environment consists of many and varied ecosystems, which are inhabited by organisms from the three domains of life including bacteria. Marine bacteria are ubiquitous; they have colonized the different marines habitats. The majority of known marine bacteria belongs to the phylum of *Proteobacteria*. The unicellular character of bacteria does not make it a type of organism that lives in isolated. Indeed these organisms live in communities, and cooperate. This cooperation is based on a molecular mechanism named quorum sensing (QS). This system is dependent on the cell density of the community, allowing bacteria to synchronize their gene expression, to coordinate some of their physiological activities such as the production of biofilms, the emission of bioluminescence or synthesis of virulence factors. This mechanism is based on the biosynthesis and the reception of signal molecules. Bacteria produce several types of signal molecules including acyl homoserines lactones (AHLs), also designed as autoinducer 1 (AI-1). AHLs are synthesized by the phylum *Proteobacteria*. The key enzyme in the AI-1 biosynthesis pathway is encoded by three gene families *luxI*, *ainS* and *hdtS*. Other signaling molecules such as the furanosyl borate diester (AI-2) are produced by wider taxonomic diversity of bacteria. The gene encoding the key enzyme of the biosynthetic pathway of AI-2 is *luxS*. Most of studies in the field of QS were carried on agronomical and biomedical bacterial models of interest. However, the importance of QS in environmental bacteria remains poorly known, especially in those living in marine environments. This doctoral thesis focuses on three major questions: What is the taxonomic and molecular diversity of marine bacteria using AI-1 based QS ? What is the prevalence of QS-based AI-1 and -2 in marine bacteria (culturable and non-culturable)? What is the functional role of QS in *Rhodobacteraceae* in the natural marine environment? In the first work presented here, we screened the MOLA collection of marine bacteria from different marine ecosystems and various geographical areas for their ability to produce AHLs. This study based on natural substance chemistry approaches, allowed to highlight original bacterial strains like *Maribius sp* MOLA 401 among others, producing new and original AHLs. The second work relied on bioinformatics approaches to screen the marine metagenome of the Global Ocean Sampling to retrieve *luxI*, *ainS*, *hdtS* and *luxS*. This work revealed the existence of a large number of original and new autoinducer synthase sequences in various marine ecosystems. Collectively, all these data on diversity, abundance and biogeographical distribution of AHL suggest that the importance of QS processes remains still underevaluated in marine microbial ecology.

Keywords : Quorum sensing / Acyl-homoserine lactone / Environmental metagenomics / Biodiversity / Marine environment / Global Ocean Sampling / Signals molecules / Marine *Proteobacteria* / Chemistry of natural products